

INRS-Institut Armand Frappier

**Effet immunomodulateur et anti-inflammatoire d'une Matrice
Protéique Malléable (MPM) issue de la fermentation du lactosérum par
*Lactobacillus kefiranofaciens subsp. R2C2.***

Par
Josée Beaulieu

Thèse présentée
pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en Virologie et Immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Jacques Bernier, Ph.D.
INRS-Institut Armand Frappier

Examineur externe

Martin Olivier, Ph.D.
Université McGill

Examineur externe

Patrick McDonald, Ph.D.
Université de Sherbrooke

Directeur de recherche

Claude Dupont, Ph.D.
INRS-Institut Armand Frappier

Directeur de recherche

Pierre Lemieux, Ph.D.
INRS-Institut Armand Frappier et
Technologie Biolactis *inc.*


RÉSUMÉ

Les aliments fonctionnels et nutraceutiques occupent une place de plus en plus importante dans l'opinion publique quant à leurs bienfaits potentiels sur la santé. De nombreuses recherches ont démontré les effets de ces produits dans la prévention et le traitement de diverses pathologies. La Matrice Protéique Malléable (MPM) est développée à partir de lactosérum fermenté par une souche probiotique, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. R2C2. La MPM ainsi obtenue est riche en bactéries lactiques, en protéines et peptides de lactosérum générés au cours de la fermentation ainsi qu'en calcium et vitamines. Tous ces constituants possèdent des effets bénéfiques démontrés sur le système immunitaire et les maladies inflammatoires. Par conséquent, l'hypothèse de recherche suivante a été envisagée, soit que la MPM posséderait des effets immunomodulateurs et/ou anti-inflammatoires.


Dans un premier temps, il a été démontré que la MPM stimule essentiellement l'immunité innée en favorisant la production de polymorphonucléaires sanguins et de certaines cytokines. Elle possède également des activités antioxydantes via la production de glutathion par les leucocytes. De plus, il a été démontré que cette immunomodulation ne résulte pas d'une réaction indésirable contre la MPM puisqu'il y a absence de production d'IgE et d'anticorps spécifiques à la MPM. Dans l'objectif de s'assurer que la stimulation de l'immunité innée par la MPM ne mène à aucun effet néfaste en situation inflammatoire, un modèle animal d'inflammation systémique a été utilisé. Dans ce modèle de dermatite de contact, la MPM possède un effet anti-inflammatoire comparable à celui d'un traitement à l'hydrocortisone oral. De plus, ce potentiel anti-inflammatoire de la MPM n'induit aucun des effets secondaires généralement associé à un traitement d'hydrocortisone suggérant un mécanisme d'action différent.

Par la suite, diverses expériences ont été réalisées dans le but d'obtenir des indications sur les mécanismes d'action de la MPM. Dans le modèle de dermatite de contact, il a été démontré que la MPM inhibe l'extravasation des neutrophiles dans les tissus. Cette observation a également été démontré dans le modèle de la poche d'air dans lequel il y a une réduction de 50% de l'infiltration leucocytaire. Cette diminution de l'extravasation est associée à une réduction marquée de la production de plusieurs cytokines et chimiokines. Par ailleurs, aucune différence dans l'activité phagocytante de ces cellules n'est observée suggérant une inhibition de l'extravasation des neutrophiles en absence d'inhibition de leurs fonctions spécifiques.

Dans l'objectif d'évaluer systématiquement l'impact de la MPM, la production de cytokines à été évaluée dans diverses conditions immunitaires différentes soit, la dermatite de contact, le modèle de la poche d'air, les animaux immunocompétents ainsi qu'en situation inflammatoire systémique légère. Dans le modèle de la dermatite de contact tout comme le modèle de la poche d'air, la production de nombreuses cytokines ont été réduites indiquant que la MPM agit sur la production des médiateurs importants de l'inflammation. La modulation de la production de cytokines dans les divers modèles animaux ainsi que les différents résultats obtenus suggèrent l'implication d'un nouveau mécanisme d'action encore très peu connu et n'ayant jamais été associé à un produit nutraceutique. Ce mécanisme d'action est relié à la régulation d'une nouvelle sous-population de lymphocytes qui a comme caractéristique principale, d'agir spécifiquement sur les neutrophiles et qui expliquerait que la MPM puisse à la fois stimuler les défenses innées et posséder un important potentiel anti-inflammatoire.


Josée Beaulieu
Étudiante doctorat


Claude Dupont
Directeur de recherche


Pierre Lemieux
Directeur de recherche

Avant-Propos

Ce projet de doctorat n'aurait pu être possible sans le support de la compagnie *Technologie Biolactis inc.* Je suis extrêmement fière d'avoir contribué durant ces années au développement de cette compagnie dans laquelle je crois et m'investis professionnellement. Par la même occasion, je tiens à remercier mon directeur de recherche chez Biolactis, le Dr. Pierre Lemieux, pour son support et ses judicieux conseils scientifiques mais également pour la belle complicité et relation de travail que nous partageons.

Je remercie également mon directeur de recherche à l'Institut Armand-Frappier, le Dr. Claude Dupont, qui m'a toujours épaulé, encouragé et aidé à surmonter les nombreuses épreuves que constitue un projet de doctorat. Claude, je ne t'ai pas souvent dit à quel point j'étais reconnaissante de ton support.

Un merci particulier au Dr. Éric Trottier pour son aide scientifique et son appui durant les dernières années de ce projet ainsi que toutes les personnes m'ayant aidé avec divers aspects scientifiques dont, Marcel Desrosiers, Roger Dubuc, Nicolas Beaudet, Éric Simard et Jean-François Lapointe. Merci aux Dr. Denis Girard, François Shareck, Alain Lamarre et Martin Pelletier pour leurs judicieux conseils tout au long de mon doctorat.

Je ne peux passer sous silence les personnes les plus importantes dans ma vie et qui ont fait en sorte que je sois rendue ici aujourd'hui. Je vous dois à tous une grande partie de ce mérite. Merci à ma famille et mes amis, vos encouragements m'ont été d'un grand support tout au long de ces années.

À mon mari David, c'est grâce à tes encouragements, ton aide et ta compréhension que j'ai pu arriver au bout de cette belle étape de ma vie. Merci pour ton appui, ta présence et ton amour.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	III
AVANT-PROPOS	V
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	XI
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1. REVUE DE LITTÉRATURE	3
1.1 LA MATRICE PROTÉIQUE MALLÉABLE (MPM)	4
1.2 EFFETS IMMUNOMODULATEURS DES PROTÉINES ET PEPTIDES DE LACTOSÉRUM ..	7
1.2.1 PROTÉINES DE LACTOSÉRUM	7
1.2.2 PEPTIDES DE LACTOSÉRUM.....	10
1.3 EFFETS IMMUNOMODULATEURS DES COMPOSANTES DES BACTÉRIES LACTIQUES	12
1.3.1 BACTÉRIES LACTIQUES	12
1.3.2 L'ADN BACTÉRIEN	14
1.3.3 LES EXOPOLYSACCHARIDES	15
1.4 EFFETS IMMUNOMODULATEURS DU CALCIUM	17
1.5 LES PRODUITS À BASE DE LAIT ET DE LACTOSÉRUM FERMENTÉS	19
1.6 LE SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	22
1.6.1 L'IMMUNITÉ INNÉE.....	22
1.6.1.1 Les récepteurs cellulaires sécrétés	23
1.6.1.2 Les récepteurs intra-cellulaires	23
1.6.1.3 Les récepteurs extra-cellulaires.....	24
1.6.2 L'IMMUNITÉ ADAPTIVE	27
1.6.2.1 La présentation antigénique aux lymphocytes T.....	27
1.6.2.2 L'activation et la différenciation des lymphocytes T	29
1.6.2.3 Le développement de la réponse mémoire	31
1.6.3 ÉTAPES CLÉS LORS DU DÉVELOPPEMENT DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE.....	33
1.6.3.1 La production de cytokines et chimiokines	33
1.6.3.2 L'extravasation	36
1.6.3.3 La phagocytose	37
1.6.3.4 La production de dérivés de l'oxygène et de l'azote.....	38
1.6.4 LA RÉACTION INFLAMMATOIRE	40
1.6.4.1 La réaction inflammatoire aiguë.....	41
1.6.4.2 Les cellules de la réaction inflammatoire aiguë	42
1.6.4.3 Le rôle de la voie du complément dans la réaction inflammatoire aiguë	45
1.6.4.4 La réaction inflammatoire chronique	47
1.6.4.5 Les cellules de la réaction inflammatoire chronique	49
1.6.4.6 Le système de coagulation et de cicatrisation.....	51
1.6.5 LE DÉVELOPPEMENT DES MALADIES INFLAMMATOIRES.....	53
1.6.6 LES PRINCIPAUX MODÈLES ANIMAUX D'INFLAMMATION	54

1.6.6.1	Modèle de la dermatite de contact.....	55
1.6.6.2	Modèle de la poche d'air « Air Pouch ».....	57
1.6.6.3	Modèle de la polyarthrite rhumatoïde.....	59
1.6.6.4	Modèle d'inflammation intestinale.....	60
1.6.7	LES MÉCANISMES DE RÉGULATION DES MALADIES INFLAMMATOIRES.....	61
1.6.7.1	Cellules T régulatrices.....	61
1.6.7.2	Modulation de l'expression des molécules d'adhésion et de la production des cytokines et chimioquinas.....	63
1.6.7.3	Régulation par les cellules Th17.....	65
1.6.7.4	Interaction des motifs CpG avec le TLR9.....	68
CHAPITRE 2	: HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	69
CHAPITRE 3	: ARTICLE I.....	72
3.1	MISE EN CONTEXTE.....	73
3.2	CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	74
3.3	RÉSUMÉ FRANÇAIS.....	75
3.4	WHEY PROTEINS AND PEPTIDES: BENEFICIAL EFFECTS ON IMMUNE HEALTH.....	76
CHAPITRE 4	: ARTICLE II.....	105
4.1	MISE EN CONTEXTE.....	106
4.2	CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	107
4.3	RÉSUMÉ FRANÇAIS.....	108
4.4	IMMUNOMODULATION BY A MALLEABLE MATRIX COMPOSED OF FERMENTED WHEY PROTEINS AND LACTIC ACID BACTERIA.....	110
CHAPITRE 5	. ARTICLE III.....	130
5.1	MISE EN CONTEXTE.....	131
5.2	CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	132
5.3	RÉSUMÉ FRANÇAIS.....	133
5.4	ANTI-INFLAMMATORY POTENTIAL OF A MALLEABLE MATRIX COMPOSED OF FERMENTED WHEY PROTEINS AND LACTIC ACID BACTERIA IN AN ATOPIC DERMATITIS MODEL.....	135
CHAPITRE 6	. ARTICLE IV.....	162
6.1	MISE EN CONTEXTE.....	163
6.2	CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	164
6.3	RÉSUMÉ FRANÇAIS.....	165
6.4	INHIBITION OF NEUTROPHIL INFILTRATION BY A MALLEABLE PROTEIN MATRIX OF LACTIC ACID BACTERIA-FERMENTED WHEY PROTEINS <i>IN VIVO</i>	167
CHAPITRE 7	. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES.....	188
7.1	ANIMAUX IMMUNOCOMPÉTENTS.....	189
7.1.1	PRODUCTION DE CYTOKINES PAR LES SPLÉNOCYTES.....	189
7.1.2	CARACTÉRISATION DES POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES DANS LA RATE ET LES PLAQUES DE PEYER.....	191
7.2	MODÈLE DE LA DERMATITE DE CONTACT.....	193
7.2.1	PRODUCTION DE CYTOKINES PAR LES SPLÉNOCYTES.....	193

7.2.2 CARACTÉRISATION DES POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES DANS LA RATE	195
7.2.3 MODULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES DES TLR2 ET TLR9 DANS LA RATE	197
7.2.4 EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE DE PRODUITS DÉRIVÉS DE LA MPM	199
7.3 EFFET DES MPM SUR LES FONCTIONS MACROPHAGIQUES	201
7.3.1 PHAGOCYTOSE	201
7.3.2 APOPTOSE	202
7.3.3 PRODUCTION DE ROS.....	204
7.4 RÉGULATION DE LA PRODUCTION DE LA CYTOKINE IL-23	206
CHAPITRE 8. DISCUSSION	208
CHAPITRE 9. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	235
BIBLIOGRAPHIE	239
ANNEXE 1. SOCIOECONOMIC AND HEALTH BENEFITS OF LACTOCEUTICALS	271
ANNEXE 2. WHEY PROTEINS AND PEPTIDES: BENEFICIAL EFFECTS ON IMMUNE HEALTH.....	280
ANNEXE 3. IMMUNOMODULATION BY A MALLEABLE MATRIX COMPOSED OF FERMENTED WHEY PROTEINS AND LACTIC ACID BACTERIA	291
ANNEXE 4. ANTI-INFLAMMATORY POTENTIAL OF A MALLEABLE MATRIX COMPOSED OF FERMENTED WHEY PROTEINS AND LACTIC ACID BACTERIA IN AN ATOPIC DERMATITIS MODEL	298

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : COMPOSITION DE LA MATRICE PROTÉIQUE MALLÉABLE.....	6
TABLEAU 2 : EFFETS DES PROTÉINES ET PEPTIDES DE LACTOSÉRUM SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	11
TABLEAU 3 : EFFETS IMMUNOMODULATEURS DES BACTÉRIES LACTIQUES ET DE LEURS COMPOSANTES.....	17
TABLEAU 4 : PRODUITS À BASE DE LAIT ET DE LACTOSÉRUM FERMENTÉ.....	19
TABLEAU 5. RECONNAISSANCE DES MOTIFS HAUTEMENT CONSERVÉS PAR LES TLR.	24
TABLEAU 6. PROFIL DES PRINCIPALES CYTOKINES PRODUITES.....	35
TABLEAU 7. PRINCIPALES MOLÉCULES D'ADHÉSION IMPLIQUÉES DANS L'EXTRAVASATION.....	37
TABLEAU 8. ÉTAPES DE LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE.....	41
TABLEAU 9 : CONCENTRATION MOYENNE DES CYTOKINES (PG/ML) DANS LA RATE DE SOURIS IMMUNOCOMPÉTENTES.....	189
TABLEAU 10 : CONCENTRATION MOYENNE DES CYTOKINES (PG/ML) DANS LA RATE DE SOURIS DANS LE MODÈLE DE LA DERMATITE DE CONTACT.....	194
TABLEAU 11 : CARACTÉRISTIQUES DES DIFFÉRENTS PRODUITS TESTÉS DANS LE MODÈLE DE DERMATITE DE CONTACT.....	200
TABLEAU 12. TABLEAU RÉSUMÉ DES RÉSULTATS OBTENUS DANS LES MODÈLES ANIMAUX PAR LA CONSOMMATION DE MPM.	210

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. VOIES D'ACTIVATION MÉDIÉES PAR LES TLR ET FAISANT INTERVENIR NF- κB ET IRF-3.	26
FIGURE 2. BOUCLE DE RÉGULATION DES CELLULES TH17.	67
FIGURE 3. EXPRESSION RELATIVE MOYENNE (%) DES CYTOKINES DANS LA RATE DE SOURIS IMMUNOCOMPÉTENTES.....	190
FIGURE 4. ÉVALUATION DES POPULATION LYMPHOCYTAIRES DANS LA RATE DES SOURIS IMMUNOCOMPÉTENTES.....	192
FIGURE 5. ÉVALUATION DES POPULATION LYMPHOCYTAIRES DANS LES PLAQUES DE PEYER DES SOURIS IMMUNOCOMPÉTENTES.	192
FIGURE 6. EXPRESSION RELATIVE MOYENNE (%) DES CYTOKINES DANS LA RATE DE SOURIS DANS LE MODÈLE DE LA DERMATITE DE CONTACT.	194
FIGURE 7. ÉVALUATION DES POPULATION LYMPHOCYTAIRES DANS LA RATE DES SOURIS DANS LE MODÈLE DE DERMATITE DE CONTACT.....	196
FIGURE 8. DEGRÉ D'EXPRESSION GÉNIQUE DU TLR2 DANS LA RATE DES SOURIS DANS LE MODÈLE DE DERMATITE DE CONTACT.	198
FIGURE 9. DEGRÉ D'EXPRESSION GÉNIQUE DU TLR9 DANS LA RATE DES SOURIS DANS LE MODÈLE DE DERMATITE DE CONTACT.	198
FIGURE 10. EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE DES DIFFÉRENTS PRODUITS DÉRIVÉS DE LA MPM DANS LE MODÈLE DE DERMATITE DE CONTACT.....	200
FIGURE 11. ÉVALUATION DU POTENTIEL PHAGOCYTANT DES MACROPHAGES PÉRITONÉAUX ACTIVÉS À LA PROTÉOSE PEPTONE.....	202
FIGURE 12. ÉVALUATION DU DEGRÉ D'APOPTOSE ET DE MORT CELLULAIRE DES MACROPHAGES PÉRITONÉAUX ACTIVÉS À LA PROTÉOSE PEPTONE.	203
FIGURE 13. ÉVALUATION DE LA PRODUCTION DE H ₂ O ₂ PAR LES MACROPHAGES PÉRITONÉAUX ACTIVÉS À LA PROTÉOSE PEPTONE.....	204
FIGURE 14. ÉVALUATION DE LA PRODUCTION DE H ₂ O ₂ PAR LES MACROPHAGES PÉRITONÉAUX NON ACTIVÉS.....	205
FIGURE 15. PRODUCTION DE LA CYTOKINE IL-23 DANS LA RATE DES SOURIS EN SITUATIONS SAINES ET INFLAMMATOIRE.	206

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

Ac	Anticorps
ACD	Atopic Contact Dermatitis
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADN	Acide Désoxyribonucléique
BSA	Bovine Serum Albumin
CMH	Complexe Majeur Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice Antigène
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
CTLA	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen
COX	Cyclooxygénase
CRP	C-Reactive Protein
DCFH-DA	2',7'-dichlorofluorescéine diacétate
EPS	Exopolysaccharide
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissue
G-CSF	Granulocyte- Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage- Colony Stimulating Factor
GMP	Glycomacropeptide
GSH	Gluthation
HC	Hydrocortisone
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IRAK	IL-1R-Associated Kinase
IRF	Interferon Regulatory Factor
IS	Immunosuppression
LAB	Lactic Acid Bacteria
Lf	Lactoferrine
LOX	Lipooxygénase
LPS	Lipopolysaccharide
MAL	MyD88 Adaptator-Like
MASP	MBL-Associated Serine Protease
MBL	Mannan Binding Lectin
MBP	Major Basic Protein
M-CSF	Macrophage- Colony Stimulating Factor
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MIF	Migration Inhibitory Factor
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MMP	Matrix Metalloproteinase
MPM	Matrice Protéique Malléable

MPO	Myéloperoxidase
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
NK	Natural Killer
NO	Nitric Oxide
NOD	Nucleotide-Binding and Oligomerization Containing Protein
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PHA	Phytohémaglutinine
PI	Iodure de Propidium
PMN	Polymorphonucléaire
RNOS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
SAP	Serum Amyloid Protein
TAP	Transporter Associated with Antigen Processing
Tc	T Cytotoxique
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T Helper
TIR	Toll Intracellular Receptor
TIRAP	TIR-Domain Containing Adaptor Protein
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAF	Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor
TRAM	TRIF-Related Adaptor Molecule
TRIF	TIR-Related Adaptor Protein Inducing Interferon Factor
UFC	Unité Formatrice de Colonie
WPC	Whey Protein Concentrate

Introduction

La santé publique est une préoccupation sans cesse grandissante à l'échelle mondiale et qui pèse lourd dans les systèmes de santé de plusieurs pays industrialisés. La population vieillissante, le rythme de vie rapide, la transformation de la nourriture, le stress constant de la vie quotidienne ainsi que la pollution sont autant de facteurs nuisibles à la santé et à la bonne forme physique. Le système immunitaire est la pierre angulaire de cette santé publique; tout effet sur la santé humaine est lié de près ou de loin au système immunitaire. On peut penser de prime abord à toute infection microbienne ou virale qu'il pourrait être possible d'éviter à l'aide d'un système immunitaire renforcé mais aussi à toute pathologie observée, en partant des troubles allergiques et autoimmuns jusqu'au cancer, qui sont dues à un système immunitaire déficient. Une bonne immunité naturelle et acquise est la clé vers une santé et une guérison future. Il incombe donc de trouver des solutions permettant une modulation et un équilibre idéal du système immunitaire et ce, en réduisant l'utilisation de médicaments qu'au stricte minimum. L'alimentation, et principalement les aliments nutraceutiques, demeure la voie d'avenir pour trouver la solution à tous ces maux et pathologies présents mondialement.

Les aliments fonctionnels et nutraceutiques, de part leur propriétés bénéfiques sur la santé humaine, connaissent un succès considérable. Effectivement, non seulement de plus en plus de chercheurs en font leur champ de spécialisation mais aussi la population y démontre un intérêt et une confiance sans borne. On peut aussi penser aux médecins qui jusqu'à ce jour croyaient que seul la médication et les traitements chimiques pouvaient guérir tous les maux existants; ceux-ci se tournent de plus en plus vers la médecine naturelle et l'alimentation pour traiter, ou du moins prévenir, les troubles de la santé. Cet intérêt grandissant pour les produits fonctionnels et nutraceutiques de la part des professionnels de la santé et de la population en général est démontré par l'augmentation de leur incidence sur le marché. En effet, on estime que le taux de croissance de ce marché est de 15%

par année, ce qui est bien au-delà de celui d'industries matures telles l'industrie pharmaceutique et celle des aliments conventionnels.

Dans cette classe de produits bénéfiques pour la santé, on retrouve des produits à base de protéines de lactosérum et des produits laitiers fermentés. Ceux-ci sont populaires du fait qu'ils peuvent être bénéfiques à un large spectre de consommateurs et ce, grâce à la versatilité de leurs bienfaits potentiels dont des effets associés à la modulation du système immunitaire. La Matrice Protéique Molléable (MPM) fut développée dans cette optique et cette dernière renferme plusieurs éléments possédant un fort potentiel pouvant offrir des bienfaits à plusieurs niveaux sur la santé humaine notamment, via la modulation du système immunitaire.

Dans le cadre de ce projet de doctorat, le potentiel immunomodulateur et anti-inflammatoire de la MPM a été évalué dans divers modèles animaux. Cette thèse débute par une revue de littérature discutant sommairement des effets connus des divers constituants de la MPM sur le système immunitaire. Par la suite, une description des caractéristiques des réactions immunitaires ainsi que les mécanismes impliqués dans les réactions inflammatoires sont rapportés pour finalement, décrire divers mécanismes de régulation des maladies inflammatoires. Les sections suivantes concernent les expérimentations effectuées dans l'objectif d'évaluer le potentiel de la MPM. Tout d'abord, les études chez des animaux immunocompétents ont permis d'évaluer l'effet de la consommation de MPM sur le système immunitaire. Ces résultats poussaient ensuite à évaluer l'impact de la MPM dans une maladie inflammatoire; cet objectif a été évalué dans le modèle de dermatite de contact. Le modèle de la poche d'air a également permis d'obtenir des indications du mécanisme d'action potentiel de la MPM. Finalement, l'évaluation de la production de cytokines dans divers modèles animaux a permis d'obtenir de sérieuses indications concernant le mécanisme d'action de la MPM tant au niveau de la stimulation de l'immunité innée qu'au niveau de ses effets anti-inflammatoires.

CHAPITRE 1. REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 La matrice Protéique Malléable (MPM)

Le lactosérum recueilli lors de la production fromagère, étant très riche en protéines laitières, doit être valorisé et utilisé à son plein potentiel. Jusqu'à ce jour, les divers procédés de valorisation du lactosérum engendrent des coûts considérables pour l'industrie fromagère et ne peuvent être rentables que pour de grandes fromageries. Il devient donc essentiel de trouver de nouvelles solutions pour valoriser le lactosérum des petites et moyennes fromageries.

La Matrice Protéique Malléable (MPM) est développée à partir de lactosérum fermenté par des bactéries lactiques créant ainsi un aliment fonctionnel possédant de nombreux avantages tant au niveau physico-chimique que pour la santé. Parmi les propriétés physico-chimiques de la MPM notons principalement des activités gélifiantes, émulsifiantes et stabilisantes [1]. De plus, la matrice ainsi développée est stable, neutre, sans odeur ni goût particulier, faible en calories et bien sûr riche en protéines. Toutes ces caractéristiques en font un produit pouvant facilement s'incorporer dans diverses préparations alimentaires à forte valeur ajoutée tant recherchés dans toutes les classes économiques et sociales de la population.

La MPM possède non seulement des caractéristiques physico-chimiques intéressantes mais aussi des bienfaits potentiels au niveau de la santé. La Matrice Protéique Malléable (MPM) renferme de nombreux éléments qui peuvent moduler le système immunitaire. Parmi ceux-ci, on y retrouve des protéines de lactosérum (en proportion principale; la β -lactoglobuline, l' α -lactalbumine et la lactoferrine), des bactéries lactiques, des vitamines (surtout la niacine et la riboflavine) et des minéraux (principalement du calcium), mais aussi de nombreux peptides issus de l'hydrolyse des protéines lors de la fermentation. Le tableau 1 présente la composition typique de la MPM. Certains peptides sont reconnus pour leurs propriétés immunomodulatrices comme des effets immunostimulants et anti-inflammatoires. Outre les effets associés aux protéines et peptides du lactosérum, la MPM contient des bactéries lactiques pouvant lui conférer de nombreux

bienfaits sur la santé comme la stimulation de l'immunité systémique et plus particulièrement de l'immunité intestinale en favorisant entre autres, la production d'IgA sécrétoire. Toutes ces composantes possèdent donc des activités immunomodulatrices et anti-inflammatoires qui peuvent se potentialiser par synergie . En effet, l'action des bactéries lactiques est beaucoup plus marquée lorsque celles-ci se retrouvent dans la nourriture et en particulier avec les produits laitiers. La présence dans ces aliments de prébiotiques et nutriments protègent les bactéries lactiques de la dégradation lors du passage dans le tractus gastrointestinal en neutralisant l'acidité [2].

TABEAU 1 : COMPOSITION DE LA MATRICE PROTÉIQUE MALLÉABLE.

<i>Composition (g/100 g)</i>		<i>Minéraux (mg/100 g)</i>	
Eau	80,0	Calcium	1507,4
Protéines	8,3	Phosphore	730,3
Lipides	1,2	Sodium	175,2
Minéraux	5,9	Potassium	142,9
Carbohydrates	4,7	Magnésium	5,4
Lactose	2,7	Sélénium	<0,1
Galactose	2,2		
LAB (UFC/100 g)	6X10 ¹¹		
<i>Oligo-éléments (µg/100 g)</i>		<i>Vitamines (µg/100 g)</i>	
Fer	240	Niacine (B3)	1000
Zinc	130	Riboflavine (B2)	320
Cuivre	70	Pyridoxine (B6)	40
Manganèse	50	Acide Folique (B9)	5
		Cobalamine (B12)	N.D
		Acide Ascorbique (C)	N.D.
<i>Profil d'acides aminés (g/100 g de protéines)</i>			
ESSENTIEL		NON-ESSENTIEL	
Isoleucine	6,5	Acide Glutamique +	
Leucine	11,9	Glutamine	22,9
Lysine	9,5	Alanine	5,7
Méthionine	2,6	Arginine	4,0
Phénylalanine	4,2	Acide Aspartique +	
Thréonine	7,5	Asparagine	10,7
Tryptophane	N.D.	Cystéine	2,2
Valine	5,9	Glycine	13,6
		Histidine	11,1
		Proline	6,3
		Sérine	7,0
		Tyrosine	3,9

N.D. = Non Déterminé

1.2 Effets immunomodulateurs des protéines et peptides de lactosérum

1.2.1 Protéines de lactosérum

Les protéines se retrouvant majoritairement dans le lactosérum sont la β -lactoglobuline (55-65%), l' α -lactalbumine (15-25%), les immunoglobulines (10-15%) et l'albumine sérique bovine (BSA) (5-10%). La lactoferrine se retrouve en quantité moindre dans le lactosérum (1-2%). Néanmoins, elle est la plus étudiée des protéines de lactosérum et une majorité des bienfaits du lactosérum lui sont attribués. Le chapitre 2 porte essentiellement sur une description détaillée des particularités et des bienfaits de chacune des protéines de lactosérum sur le système immunitaire. Conséquemment, un bref résumé ainsi que les récentes découvertes de leurs effets immunomodulateurs seront rapportées dans cette section.

Les premières études sur les effets des protéines de lactosérum portaient principalement sur leur pouvoir antioxydant via la stimulation de la production de glutathion (GSH) [3, 4]. L'activité antioxydante confère des propriétés de protection à l'organisme contre les radicaux libres mais aussi une protection contre certains type de cancers [5-7]. Il est connu que la capacité antioxydante des patients HIV+ est diminuée ayant pour conséquence, de favoriser le développement d'infections. Des études ont démontré que la consommation de protéines de lactosérum par des sujets HIV+ favorise la production de GSH par les cellules immunitaires, suggérant un potentiel anti-infectieux intéressant pour ces patients [8, 9].

La production d'anticorps spécifiques suite à une stimulation antigénique est augmentée par la consommation de protéines de lactosérum indiquant une application potentielle comme adjuvant oral [10-13]. Cependant, il a récemment été démontré qu'une supplémentation en protéines de lactosérum chez des enfants souffrant d'asthme atopique, une maladie de type Th2, réduisait considérablement

la production d'IgE. La consommation de lactosérum modulerait donc certains processus de régulation du système immunitaire [14]. Ces résultats démontrent que les protéines de lactosérum augmentent les défenses immunitaires via la production d'anticorps spécifiques de type IgG et IgM mais qu'à l'opposé, elles peuvent diminuer les anticorps de type IgE principalement responsables des réactions allergiques. La régulation de la production d'anticorps par les protéines de lactosérum est différente selon la spécificité des anticorps et les conditions immunitaires de l'organisme ce qui peut permettre à la fois une stimulation de l'immunité et un effet anti-allergique.

Plusieurs études sur les protéines de lactosérum ont démontré leur potentiel de stimulation de l'immunité innée. Elles stimulent l'activité des macrophages et des neutrophiles en augmentant leur potentiel phagocytant [15] et la production de cytokines [15-17]. La consommation de protéines de lactosérum stimule la production et l'activité des cellules NK (Natural Killer) chez des individus sains [18, 19], cancéreux [6, 20] ou atteints d'infections virales [21]. Or, une des fonctions principales des cellules NK est la défense contre les tumeurs et les virus. La consommation de produits à base de protéines de lactosérum amènerait une stimulation des défenses immunitaires dans ces types d'affections.

Malgré la stimulation de l'immunité innée, de nombreux effets anti-inflammatoires dans divers modèles animaux ont été identifiés. La protéine lactoferrine a démontré des effets protecteurs dans le modèle de la dermatite de contact. Une pré-application de lactoferrine sur l'abdomen des souris avant l'ajout de l'agent irritant diminue l'activité des cellules de Langerhans. Ceci se traduit par une diminution de la migration des cellules aux ganglions lymphatiques et par conséquent une faible activation des lymphocytes effecteurs [22]. Quelques équipes ont démontré dans divers modèles animaux arthritiques que les protéines de lactosérum et en particulier, la lactoferrine, possèdent des effets anti-inflammatoires dues à l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires TNF α (Tumor Necrosis Factor α) et IL(Interleukine)-6 [23-25].

Les protéines de lactosérum ont démontré un potentiel de prévention et de traitement des colites ulcéreuses et d'inflammations intestinales [26-28]. L'équipe de Togawa a déterminé que le mécanisme d'action responsable de la diminution des inflammations intestinales était associé à une inhibition des cytokines inflammatoires et une stimulation de la production des cytokines régulatrices [26, 27]. De plus, une étude clinique réalisée chez 21 patients atteints de fibrose kystique a démontré le potentiel anti-inflammatoire des protéines de lactosérum (attribué à leur pouvoir antioxydant) dans le traitement et le soulagement de cette maladie [29]. Dans les études en situation inflammatoire, la modulation de la production des cytokines pro-inflammatoires a régulièrement été identifiée comme étant le principal effet anti-inflammatoire connu des protéines de lactosérum [22, 24, 30, 31].

Les protéines de lactosérum possèdent des effets opposés quant à la stimulation de l'immunité via entre autres, l'augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires chez des individus sains alors qu'ils démontrent également des effets anti-inflammatoires. Ces observations suggèrent un mécanisme de régulation par les protéines de lactosérum qui est dépendant de l'état d'activation des cellules immunitaires. Les protéines de lactosérum semble pouvoir activer l'immunité lorsqu'aucun stimulus inflammatoire n'est présent. Cependant, lorsque les cellules sont hyperactivées en situation inflammatoire, les protéines de lactosérum permettent une régulation de cet état d'activation. Une stimulation de la production des cytokines régulatrices IL-10 [24] et TGF β (Transforming Growth Factor β) [32] a été rapportée dans quelques études expliquant en partie, les activités régulatrices obtenues avec les diverses protéines de lactosérum.

1.2.2 Peptides de lactosérum

Lors de la fermentation du lactosérum par la souche de bactérie lactique *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2, de nombreux peptides sont générés. Le chapitre 2 traite également des effets immunomodulateurs des peptides de lactosérum et par conséquent, cette section résumera leur effets sur le système immunitaire.

De nombreux effets immunomodulateurs rapportés pour la consommation de protéines de lactosérum ont également été associés à des peptides dérivés de ces protéines. Par conséquent, il est suggéré que les effets identifiés pour les protéines de lactosérum pourraient être, en partie, dus aux peptides générés durant la digestion. Certaines études ont démontré que les peptides de lactosérum possédaient un potentiel antioxydant [33-35]. Tel que mentionné précédemment, cette capacité antioxydante confère à l'organisme une meilleure défense immunitaire contre divers type de cancers. Plusieurs peptides de lactosérum sont connus pour stimuler la défense immunitaire innée. Ils favorisent la prolifération et l'activité (phagocytose, production de dérivés de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) et production de cytokines) des macrophages et des neutrophiles [15, 17, 36-39]. De plus, il est connu que les peptides de lactosérum inhibent la ACE (Angiotensin-Converting Enzyme) [40]. La ACE inactive la bradykinine qui est responsable de l'activation des macrophages et de la production de cytokines. Conséquemment, l'inactivation de la ACE favorise l'activation de la bradykinine et donc, la stimulation des macrophages.

Les peptides de lactosérum démontrent également des effets qui suggèrent un potentiel anti-inflammatoire. L'effet anti-inflammatoire d'un isolat de protéine de lactosérum a été démontré dans un modèle de fibrose kystique et serait attribué à une augmentation de la production de GSH [29]. Vilela *et al.* suggère que les peptides de lactosérum contenu dans cet isolat moduleraient cet effet. Ils ont également démontré une réduction de la production de IL-8 par les

cellules épithéliales du poumon dans ce modèle [35]. Aussi, des peptides issus de la lactoferrine réduiraient la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 suite à une stimulation par le LPS [31].

La stimulation de la tolérance orale au lait a aussi été associée aux peptides du lactosérum et plus particulièrement, aux peptides de la β -lactoglobuline [41-44]. La β -lactoglobuline étant la principale responsable du développement des allergies aux produits laitiers. Conséquemment, la stimulation préalable avec des peptides issus de la β -lactoglobuline favorise le développement de la tolérance orale à cette protéine.

TABLEAU 2 : EFFETS DES PROTÉINES ET PEPTIDES DE LACTOSÉRUM SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE.

Fraction	Bienfaits	Références
Protéines	Activité antioxydante Activité humorale Activité anti-cancéreuse Réduction des allergies Stimule la phagocytose Production de cytokines Stimule les cellules NK Production de cytokines régulatrices Activité anti-inflammatoire Inhibition des cytokines Th1	[3, 4, 9, 29] [10-13] [5-7, 20] [14] [15] [15-17] [6, 18-21] [24, 32] [22, 23, 25-29] [22-24, 30, 31]
Peptides	Stimule la phagocytose Production de cytokines Activité antioxydante Activité anti-inflammatoire Réduction des allergies au lait	[15, 17, 36-38] [15, 17, 38] [33-35] [31, 35] [41-44]

1.3 Effets immunomodulateurs des composantes des bactéries lactiques

1.3.1 Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (LAB), communément appelées probiotiques, se définissent comme étant tout micro-organisme vivant qui, lorsqu'administré en quantité adéquate, confère des bénéfices sur la santé de l'hôte. Les genres bactériens *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont les principales bactéries identifiées et caractérisées. Néanmoins, on retrouve aussi sous l'appellation probiotiques certains *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* et *Enterococcus*.

Depuis quelques décennies, de nombreux chercheurs de tous les coins du monde s'intéressent aux bienfaits potentiels de différentes bactéries lactiques. La liste des bienfaits de ces bactéries est très exhaustive (résumé des effets au Tableau 3) et comporte notamment la stabilisation de la microflore intestinale [45], la synthèse de vitamines du groupe B [46, 47], la réduction de la concentration de cholestérol et de lipides sanguin [48, 49], la réduction des symptômes de l'intolérance au lactose [45], des effets anti-tumoraux et anti-cancérogènes [45] et de nombreux effets sur le système immunitaire.

La littérature regorge d'études démontrant les effets des bactéries lactiques sur le système immunitaire. De nombreuses études ont démontré que les probiotiques stimulent les défenses innées de l'organisme. Tout d'abord, ils favorisent la production de plusieurs cytokines ayant pour but de stimuler l'immunité innée dont le TNF α , IL-6, IL-12, IL-18 et IFN γ (Interféron γ) [50, 51]. Les probiotiques favorisent l'activité des cellules impliquées dans les défenses naturelles dont, les cellules NK, les neutrophiles et les macrophages. De plus, une augmentation significative de la phagocytose a été observée suite à l'ingestion de probiotiques [52-55]. La phagocytose permet une première défense de l'organisme contre les agents pathogènes. Les cellules NK sont très importantes pour la défense de l'organisme contre les infections virales et les

tumeurs. Hori et *al.* ont démontré que l'activité de ces cellules NK, diminuant en fonction de l'âge, est stimulée par l'ingestion de probiotiques [56]. Il a aussi été observé que l'activité des cellules NK est stimulée par l'ingestion de bactéries lactiques, indépendamment de l'âge, suggérant une stimulation des défenses naturelles contre les virus et tumeurs [53, 57-59]. La lymphoprolifération suite à la costimulation par des probiotiques et des mitogènes est augmentée indiquant une stimulation de l'activité des lymphocytes [53]. Ce résultat suggère que les probiotiques favorisent une réaction lymphocytaire plus importante suite à la stimulation par un antigène.

Par ailleurs, les probiotiques possèdent des activités immunomodulatrices sur le système immunitaire humoral. Ils induisent la production de cytokines nécessaires à la production d'anticorps soit IL-4 et IL-5 [50] suggérant qu'ils possèdent un potentiel de stimulation de l'immunité humorale. Plusieurs études ont effectivement prouvé que les probiotiques favorisent la production d'anticorps spécifiques à un antigène et ont la capacité de protéger des infections [47, 53, 60, 61]. La production d'IgAs (Immunoglobuline A sécrétoire) par les plaques de Peyer est également augmentée suite à la consommation de probiotiques indiquant qu'il y a stimulation de l'immunité intestinale et ce, particulièrement suite à l'ingestion d'un antigène [62-64]. L'immunité mucoale est importante dans le développement de la tolérance orale et par le fait même, notons que les probiotiques possèdent des activités régulatrices sur les réactions immunitaires. Effectivement, malgré la stimulation de la production d'anticorps, il est clairement démontré que les probiotiques réduisent la production d'IgE lors des réactions allergiques [52, 65, 66]. Plusieurs études cliniques chez les enfants ont été effectuées afin de confirmer, avec succès, le potentiel des probiotiques sur la réduction des allergies [67-70]. La réduction de la production d'IgE par les probiotiques peut être expliquée en majeure partie, par la stimulation de la tolérance orale.

Dans le même ordre d'idée, il a été démontré dans de nombreuses études, que les probiotiques ont des effets anti-inflammatoires et ce, malgré la démonstration d'une stimulation du système immunitaire inné. Chapat *et al.* ont démontré que *Lactobacillus casei* favorise la production de cellules CD4+ ayant un rôle de régulation dans un modèle d'inflammation de la peau médié par les cellules CD8+ [71]. De nombreuses études ont rapporté que les probiotiques peuvent soulager ou réduire les maladies inflammatoires de l'intestin telle la colite ulcéreuse [72-75]. Cependant, ces études sur les pathologies intestinales doivent être confirmées chez l'humain afin de s'assurer de l'absence de réactions indésirables par exemple, la translocation bactérienne pouvant survenir due à une destruction des parois intestinales [76].

Plusieurs bactéries lactiques possèdent des activités régulatrices pouvant expliquer la stimulation du système immunitaire autant inné qu'adaptif malgré un potentiel de suppression des allergies et maladies inflammatoires. Effectivement, plusieurs probiotiques favorisent la production de cellules T régulatrices pouvant synthétiser ou non, les cytokines régulatrices IL-10 et TGF β [51, 77-80]. Les cellules T régulatrices ont pour rôles principaux de favoriser le développement de la tolérance orale, contrôler le développement des réactions allergiques et de diminuer l'inflammation dans le cas de maladies inflammatoires [81, 82].

1.3.2 L'ADN bactérien

Depuis la découverte que l'ADN bactérien est reconnu par le système immunitaire et contribuerait au développement d'une réponse immunitaire, il a été envisagé que l'ADN des bactéries lactiques pourrait être responsable de certains de leurs effets immunomodulateurs (résumé des effets au Tableau 3). Plusieurs études démontrent que l'ADN bactérien stimule la production et l'activité des cellules NK [83, 84], est mitogénique pour les lymphocytes [85, 86], favorise la production de cytokines pro-inflammatoires [84, 87-89] et pourrait être utilisé comme adjuvants oraux [90-93]. Plus précisément, les motifs CpG non-

méthylés et certains oligodéoxynucléotides issus de souches probiotiques ont récemment été étudiés quant à leurs effets sur le système immunitaire. Kitazawa *et al.* ont démontré que des oligonucléotides contenant uniquement les bases nucléiques adénine (A) et thymine (T) provenant de *Lactobacillus gasseri* favorisent le développement des lymphocytes B [94]. La même équipe a aussi démontré que des motifs CpG de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* favorisent non seulement la prolifération des lymphocytes B mais agissent aussi sur les cellules des plaques de Peyer afin de stimuler l'immunité intestinale [95]. Un oligodéoxynucléotide provenant de la souche *Lactobacillus gasseri* JCM1131 favorise la production de cytokines Th1 via une interaction avec le TLR9 (Toll-Like Receptor) [96]. Dans les modèles animaux de colite ulcéreuse, il a été suggéré que les probiotiques protègent l'inflammation via l'interaction entre leur ADN et le TLR9 menant à la production d'interféron de type 1 [97-99]. Finalement, l'ADN des probiotiques favorise aussi la production de la cytokine régulatrice IL-10 [100].

1.3.3 Les exopolysaccharides

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polysaccharides à longue-chaîne sécrétés principalement par les bactéries, les champignons et les levures. Leurs principaux rôles seraient de protéger les bactéries de leur environnement par la formation de biofilms, et de faciliter l'adhésion de ces dernières aux surfaces et à différents types cellulaires [101]. Dans l'industrie alimentaire, les EPS sont principalement reconnus pour leurs propriétés gélifiantes, épaississantes et pour apporter une certaine stabilité aux produits [102].

Les EPS possèdent de nombreuses vertus sur la santé (résumé des effets au Tableau 3) notamment, des effets anti-tumoraux [103], anti-ulcéreux [104], diminuent le cholestérol sanguin et possèdent des effets immunomodulateurs [105, 106]. De nombreux types d'exopolysaccharides sont connus aujourd'hui et leurs bienfaits potentiels sur le système immunitaire sont très variables

dépendamment de leur provenance. Parmi les plus connus des polysaccharides immunomodulateurs, notons les polysaccharides PS A et PS B provenant de *Bacteroides fragilis* [107-109], le β -(1-3)-glucan issu de levures et de fungi [110-113], le mannan produit par *Candida albicans* [114-116] ainsi que les polysaccharides PSK et PSP issus des champignons [117, 118].

Les bactéries lactiques produisent aussi des EPS possédant d'intéressants effets immunomodulateurs. Les effets observés sont très variables et dépendent de l'origine et de la composition des EPS. L'équipe de Daniel Oth a démontré que les EPS *in vitro* et *ex vivo* stimulent la production de cytokines pro-inflammatoires autant chez la souris que chez l'humain, indiquant une stimulation du système immunitaire inné [105]. Le kéfiran, un exopolysaccharide issu de la fermentation du kéfir, possède une activité anti-inflammatoire [119] et anti-tumorale [120]. L'équipe de Kitazawa *et al.* a rapporté qu'un EPS provenant de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* stimule l'activité phagocytante des macrophages *in vitro* et *in vivo* indiquant une amélioration des défenses naturelles non spécifiques de l'organisme [121]. Le même type de EPS avait précédemment été identifié pour son pouvoir mitogénique sur les lymphocytes [122] et pour son pouvoir de stimulation de la production de cytokines par les macrophages [123]. Certaines souches de *Lactococcus lactis* produisent des EPS possédant des activités stimulantes sur les cellules B et induisent la production d'anticorps spécifiques à des pathogènes indiquant que les EPS pourraient aussi servir comme adjuvants oraux [124, 125]. Certains EPS de bactéries lactiques possèdent également des activités de stimulation des lymphocytes T [126, 127]. Il a été démontré que les EPS dérivant des souches *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus B3* et *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus A13* possèdent un effet anti-inflammatoire dans le modèle de colite ulcéreuse [128].

TABLEAU 3 : EFFETS IMMUNOMODULATEURS DES BACTÉRIES LACTIQUES ET DE LEURS COMPOSANTES.

Composantes	Bienfaits	Références
Bactéries lactiques	Diminution des allergies Stimulation de l'immunité mucoale Augmentation des défenses innées Réduction des maladies inflammatoires Augmentation des réponses cellulaires Stimulation de la phagocytose Réduction des maladies inflammatoires de l'intestin	[47, 65-67, 69, 70, 129] [66, 67, 130] [53, 58, 78, 129, 131] [66, 71, 132, 133] [47, 52, 66, 133] [52, 57, 66, 130] [72-77]
ADN Bactérien	Prolifération des lymphocytes B Stimule l'immunité intestinale Favorise la production de cytokines Th1 Favorise la production IL-10 Réduit l'inflammation intestinale dans la colite ulcéreuse	[94, 95] [95] [96] [100] [97-99]
EPS	Favorise la production de cytokines Th1 Effet ant-inflammatoire Effet anti-tumoral Augmentation de la phagocytose Stimulation des lymphocytes Production d'anticorps	[105, 123] [119, 128] [120] [121] [122, 126, 127] [124, 125]

1.4 Effets immunomodulateurs du calcium

La MPM contient une grande proportion de calcium, soit plus de 1500 mg/100 g. Il est donc suggéré que certains des effets associés au calcium, pourraient être conféré à la MPM. De façon générale, le calcium est bien reconnu comme ayant un effet préventif contre l'ostéoporose surtout lorsque combiné à la consommation de vitamine D [134-136]. Le calcium possède aussi des effets bénéfiques pour contrer l'hypertension [137, 138], l'hypercholestérolémie [139, 140] et l'obésité [141-145]. De nombreuses études ont aussi rapporté un effet préventif sur le développement de cancer colorectal [146, 147]. Cette protection serait, en grande partie, reliée à la diminution de la récurrence des polypes intestinaux constituant le principal risque de développement de cancer colorectal [148-150].

Les effets de la consommation de supplément de calcium sur le système immunitaire ont été très peu étudiés. Une étude effectuée avec des oiseaux exposés au plomb a illustré que l'exposition parallèle au calcium permet d'éliminer les effets secondaires du plomb sur leur système immunitaire. En effet, l'exposition au plomb supprime la réponse humorale secondaire et cet effet a été aboli en présence de calcium [151]. La plupart des études sur les effets du calcium sur l'immunité ont été réalisées *in vitro*. La stimulation d'éosinophiles par le surnageant de macrophages alvéolaires dérivés de bronches de patients asthmatiques en parallèle à une exposition au calcium démontre une production accrue de leukotriène C4 indiquant une stimulation de l'activité des cellules immunitaires par le calcium [152]. La stimulation de cellules T humaines avec de hautes concentrations de calcium mène à l'expression du récepteur de IL-2 sans production accrue de la cytokine IL-2 [153]. Cette surexpression unique du récepteur de IL-2 sur les cellules indiquent une prolifération cellulaire minimale s'il n'y a pas de costimulation par un mitogène. Par contre, la costimulation par le calcium et un mitogène provoque une augmentation considérable de la prolifération cellulaire suggérant que le calcium possède des effets minimes sur les cellules immunitaires en absence de stimulation mais active ces cellules lors d'une défense face à un stimulus [153]. D'un autre côté, la production de IL-2 est stimulée chez des cellules T primaires provenant de thymus de souris exposées au calcium [154]. Ces études suggèrent que le calcium favorise la capacité des cellules primaires à réagir à un stimulus mais possède un effet moindre sur des cellules pleinement différenciées en absence de stimulation mitogénique. L'équipe de Matsushima a démontré que la stimulation par le calcium de thymocytes murins et de PMN humains favorise la production de IL-1 [155]. Cette augmentation de la production de cytokines, notamment de IL-1 et IL-2, a aussi été confirmée par la stimulation de lymphocytes T en présence de calcium [156, 157]. Ces résultats démontrent que le calcium pourrait présenter un rôle immunomodulateur principalement dans la stimulation de l'immunité innée.

1.5 Les produits à base de lait et de lactosérum fermentés

Les recherches prometteuses sur leur nombreux bienfaits des produits de santé naturelle font en sorte que l'on en retrouve de plus en plus sur le marché notamment des produits à base de lait et de lactosérum fermenté. Le tableau 4 dresse une liste partielle de ces principaux produits ainsi que leurs effets connus. Les effets les plus souvent répertoriés de ces produits touchent essentiellement la gestion des lipides sanguins, des effets anti-hypertenseurs et immunomodulateurs.

TABLEAU 4 : PRODUITS À BASE DE LAIT ET DE LACTOSÉRUM FERMENTÉ.

Catégories	Nom du produit ou protéine/peptide	Action	Compagnies	Espèces testées
Laits fermentés	Yakult Honsha	Réduction des triglycerides	Yakult	hamsters
	<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> OLL1073R-1	Réduction de l'arthrite	Meiji Dairy Co.	rats
	Kefram-Kefir	Réponse à l'insuline	Nihon Kefir Co., Fujisawa	souris
	Calpis (<i>L. Helviticus</i>)	Anti-hypertension	Calpis Food Industry Co	humains
	Evolus (<i>L. Helviticus K16H</i>)	Anti-hypertension	Valio, Ltd	humains
	Actimel	Contrôle des diarrhées	Danone	humains
	Biola (<i>L. GG</i>)	Désordres à l'estomac	Tine	humains
	Gaio	Contrôle du cholestérol	Gaio	humains
	<i>L. Helveticus R389</i>	Immunostimulation	Institut Rosell	souris

	- <i>Lactobacillus casei</i> TMC0409 - <i>Streptococcus thermophilus</i> TMC 1543	Contrôle des lipides anguins et de l'hypertension	Takanashi Milk Products Co., Ltd	humains
Lactosérum fermentés	Nutractis	Multifonctions	Technologie Biolactis Inc.	humains
Protéines de lait ou lactosérum	Lactoferrine	Immunistimulation, Multifonctions	DMV International, Glanbia	humains
	Lactoperoxidase	Anti-infectieux	DMV International, Glanbia	Humains
	HMS90 (Immunocal)	Stimulation du glutathion	Immunotech Research Ltd	humains
	Prodiet 352 EFA(α -lactalbumin)	Anti-bactérien, fixation des minéraux et immunostimulation	Ingredia	humains
	Volactive	Antioxydant, anti-bactérien et immunomodulateur	Volac International	humains
	Imuplus	Immunistimulation	Biogene	humains
Peptides bioactifs du lait ou lactosérum	Prodiet F200	Diminution du stress	Ingredia	Rats, humains
	Biopure-GMP	Satiété, protection contre les toxines, les bactéries et les virus. Immunomodulation	Davisco, Land O'Lakes	humains
	Biozate	Anti-hypertension	Davisco	humains

Protéines du lait ou lactosérum servant de véhicule ou matrice protectrice pour des ingrédients bioactifs	Lipidolactis (synergie avec des vitamines B)	Réduction des triglycérides	Technologie Biolactis Inc.	Rats
	Lactoal (Calcium, Phosphate, Magnesium)	Ostéoporose et santé des os	DMV International	Humains
	TruCal (Calcium)	Ostéoporose et santé des os	Glanbia	humains
	Omega-3 (CV-17)	Prévention des maladies cardiaques et diminution des taux de cholestérol	Puleva Biotech	humains
	Vitamine D	Prévention des maladies osseuses	Milk companies	humains

Traduction de :

Pierre Lemieux, Josée Beaulieu and Éric Simard. (2004) **Socioeconomic and health benefits of lactoceuticals.** *Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research* 4 (2): 199-206.

Reproduit avec la permission de Future Medicine Ltd.

Note : Voir Annexe 1 pour article complet

1.6 Le système immunitaire

Depuis la découverte d'un phénomène de protection de l'organisme par Edward Jenner en 1796 et par la suite par Louis Pasteur en 1880, les chercheurs ont démontré de l'intérêt envers les mécanismes de défenses immunologiques. Les nombreuses recherches ont permis de comprendre comment le corps se défend contre une invasion pathogénique. Les différents types de leucocytes ont des rôles très différents à jouer dans les deux lignes de défense de l'organisme; soit dans l'immunité innée (ou naturelle) et dans l'immunité adaptative (ou acquise). Les effets immunomodulateurs de différents produits nutraceutiques et de probiotiques ont été bien démontrés tel que décrit aux sections précédentes. Par conséquent, afin de bien comprendre comment certains résultats obtenus avec ces produits ainsi que ceux qui seront rapportés dans cette thèse concernant la MPM peuvent influencer l'immunité, un bref rappel des notions d'immunologie innée et adaptative est essentiel.

1.6.1 L'immunité innée

Le système immunitaire inné est la première ligne de défense de l'organisme; cette réaction n'est pas spécifique à un antigène particulier et elle ne nécessite pas une exposition préliminaire à l'antigène. Divers paramètres dont l'alimentation influencent l'activité et le nombre des cellules immunitaires naturellement présentes chez un individu [158-160]. Outre les barrières épithéliales dont leur rôle est de limiter l'entrée d'un pathogène, les macrophages et les granulocytes effectuent la première ligne de défense de l'organisme. Ces cellules possèdent à leur surface des récepteurs membranaires permettant la reconnaissance des motifs hautement conservés des agents pathogènes (Pathogen-Associated Molecular Patterns : PAMP). Ces récepteurs peuvent être exprimés à la surface, dans les compartiments intracellulaires ou sécrétés dans la circulation sanguine ou les fluides tissulaires.

1.6.1.1 Les récepteurs cellulaires sécrétés

Parmi les récepteurs sécrétés notons les MBL (mannan-binding lectin), CRP (C-reactive protein) et SAP (serum amyloid protein). Ces molécules sont sécrétés par le foie durant la phase aiguë d'une infection [161, 162]. Ils permettent l'activation de la voie classique du complément en se liant entre autres, au C1q [163]. Le MBL s'associe spécifiquement aux résidus mannoses qui sont abondants à la surface des microorganismes ce qui permet par la suite, une association avec les MASP (MBL-associated serine protease). Cette association active la voie lectine du complément en libérant les protéines C2 et C4 [162, 164] et permet ainsi d'activer le processus de destruction des pathogènes.

1.6.1.2 Les récepteurs intra-cellulaires

Les virus et certains pathogènes peuvent entrer directement à l'intérieur des cellules, c'est pourquoi les cellules immunitaires possèdent également des récepteurs exprimés dans le cytosol afin d'assurer une reconnaissance de ce type d'infection. Notamment, les protéines kinases PKR sont activés suite à la reconnaissance de l'ADN viral. L'activation des PKR bloquent la réplication virale en inactivant le facteur d'initiation de la transcription eIF2 α [165]. L'activation des PKR mène également à l'activation de la voie MAP kinase et ainsi, permet l'induction d'INF de type 1 possédant une activité anti-virale [165, 166]. La famille des protéines NOD (nucleotide-binding and oligomerization containing protein) reconnaissent une grande quantité de ligands dont le LPS, ce qui permet l'activation de la voie NF- κ B et donc, la production de cytokines pro-inflammatoires [167].

1.6.1.3 Les récepteurs extra-cellulaires

Les récepteurs exprimés sur les membranes cellulaires comprennent notamment, les « Toll-like Receptors » (TLR) reconnaissant divers PAMP rapportés au Tableau 5 [168, 169]. Lors d'une reconnaissance d'un PAMP, la stimulation des TLR permet l'activation de voies de signalisation menant à la stimulation de la défense immunitaire. Les voies de signalisation activées sont complexes et quelques unes sont communes à tous les TLR mais certaines sont plutôt spécifiques à un TLR en particulier [170].

TABLEAU 5. RECONNAISSANCE DES MOTIFS HAUTEMENT CONSERVÉS PAR LES TLR.

TLR	Motifs hautement conservés	Type de pathogène
TLR1	Lipoprotéines (Co-récepteur avec TLR2)	Bactéries Gram +
TLR2	Lipoprotéines (Co-récepteur avec TLR1) Peptidoglycan (Co-récepteur avec TLR6)	Bactéries Gram + Mycobactéries Levures
TLR3	ARN double-brin	Virus
TLR4	Lipopolysaccharides	Bactéries Gram -
TLR5	Flagelles	Bactéries flagellées
TLR6	Peptidoglycan (Co-récepteur avec TLR2)	Bactéries Gram + Mycobactéries Levures
TLR7	ARN simple-brin	Virus
TLR8	ARN simple-brin	Virus
TLR9	Motif CpG – Oligodéoxynucléotides non méthylés	Bactéries
TLR10	Inconnu Phylogénétique proche de TLR1 et TLR6 : co-récepteur ???	???
TLR11 murin	???	<i>E. coli</i> uropathogènes <i>Toxoplasma gondii</i>

Informations tirées de : Akira (2006) [169], Kawai et Akira (2006) [168], Yarovsky *et al.* (2005) [171]

La voie d'activation majoritairement impliquée est celle menant à l'activation du facteur de transcription NF- κ B [170, 172]. L'association du récepteur intracellulaire Toll (TIR), aussi connu comme étant le récepteur de IL-1, avec la molécule adaptatrice MyD88 permet le recrutement et l'activation de IRAK-4 (IL-1R-associated kinase-4). Une fois IRAK-4 activé, cette association permet la phosphorylation et donc conséquemment, l'activation de IRAK-1 qui recrutera TRAF-6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6). Cette cascade d'activation, illustrée à la figure 1, mène à l'activation de NF- κ B, un facteur de transcription des cytokines pro-inflammatoires [170, 172]. Parmi les cytokines les plus rapidement produites suite à la reconnaissance de pathogènes, il y a IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 et TNF α . Le rôle principal de ces cytokines est le recrutement et l'activation de diverses cellules immunitaires afin d'assurer la défense contre l'agent pathogène préalablement reconnu [173].

La molécule adaptatrice TIRAP (TIR-domain containing adaptor protein), aussi connue sous le nom de MAL (MyD88 adaptator-like), se lie à la réaction de reconnaissance des PAMP impliquant les TLR1, TLR2, TLR4 et TLR6 (Figure 1) et mène également à l'activation de NF- κ B et donc, à la production des cytokines pro-inflammatoires [170]. Cette réaction est aussi reliée à une voie d'activation indépendante de MyD88. La molécule adaptatrice TRAM (TRIF-related adaptor molecule) est également impliquée dans une voie d'activation indépendante de MyD88 et est spécifique au TLR4. TRAM utilise la même séquence d'activation que TIRAP et donc, permet l'activation de NF- κ B [172].

Une autre voie d'activation, illustrée également à la figure 1, commune aux TLR3 et TLR4 est celle faisant intervenir la molécule adaptatrice TRIF (TIR-related adaptator protein inducing interferon factor). Cette voie d'activation, indépendante de la molécule adaptatrice MyD88, est caractérisée par l'activation de IRF3 (interferon regulatory factor 3) par TRIF qui mène conséquemment à la production d'IFN de type 1 [174]. Les interférons sont sécrétés par la voie d'activation médiée par IRF3 en partie, lors de la reconnaissance d'infections

virales [170]. Or, le rôle principal associé aux INF de type I est une défense anti-virale [166, 175]. Cependant, il a également été démontré que les IFN de type I permettent de maintenir une homéostasie adéquate dans la production des cellules immunitaires en régulant la différenciation cellulaire dans la moëlle osseuse [176, 177].

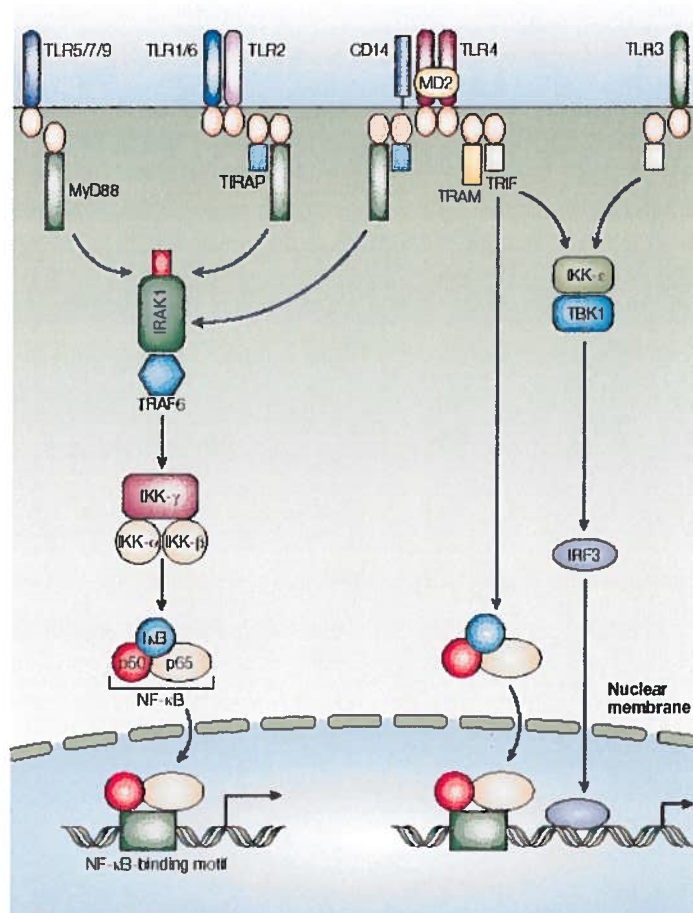


FIGURE 1. VOIES D'ACTIVATION MÉDIÉES PAR LES TLR ET FAISANT INTERVENIR NF-κB ET IRF-3.
(adapté de Akira et Takeda, 2004 [170])

1.6.2 L'immunité adaptive

Le système immunitaire adaptif, qui fait intervenir toutes les cellules immunitaires et qui est en majorité gouverné par les lymphocytes, est caractérisé par une réponse immunitaire spécifique à un agent pathogène particulier. Le développement de la réponse immunitaire adaptive s'effectue en trois étapes. La première étape est la présentation antigénique par les CPA aux lymphocytes T lors de la rencontre de l'antigène dans les organes lymphoïdes ayant drainé l'antigène. Par la suite, il y aura différenciation des lymphocytes TCD4+ en lymphocytes T inflammatoires ou T auxiliaires et activation de ces cellules TCD4+ et/ou TCD8+. Finalement, la dernière étape de la réponse immune adaptive est le développement de la réponse mémoire. Les récepteurs de surface reconnaissant les PAMP sont également très importants dans le développement de la réponse immune adaptive. Par exemple, les TLR favorisent la production de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IFN γ menant à l'activation des macrophages et des cellules T [178].

1.6.2.1 La présentation antigénique aux lymphocytes T

L'étape de la présentation antigénique débute dès la rencontre d'un antigène par les CPA, essentiellement par les cellules dendritiques. Les CPA réagissent à deux types de signaux; par la reconnaissance directe des pathogènes via leur récepteurs spécifiques de surface interagissant avec les PAMP ou par un mécanisme indirect via entre autres, la présence de cytokines inflammatoires [179]. Les particules sont internalisées par phagocytose alors que les antigènes solubles le sont plutôt par macropinocytose [180]. Malgré que ces deux mécanismes permettent la formation de larges vacuoles intracellulaires, la macropinocytose est caractérisée par l'internalisation non-spécifique de grande quantité de fluide environnant. Pour sa part, la phagocytose implique des récepteurs spécifiques et une cascade de transduction de signal [180].

L'internalisation d'un antigène est effectuée par des cellules immatures. Cette internalisation permet la maturation des CPA durant laquelle, la capacité d'endocytose diminue limitant ainsi la quantité d'antigènes pouvant être présentée. Cette diminution de la capacité d'internalisation est due à une diminution de l'expression des récepteurs à la surface et la diminution de l'activité de phagocytose ou de macropinocytose [180]. La maturation des CPA transforme ainsi ces cellules en cellules effectrices capables de stimuler les cellules T. L'augmentation de l'expression des récepteurs des chimiokines et des molécules d'adhésion permet la migration des CPA aux organes lymphoïdes secondaires [181]. Par la capture de l'antigène, la liaison peptidique et la migration des CPA, ces cellules restreignent la présentation antigénique qu'à l'antigène internalisé durant la maturation permettant ainsi la stimulation des cellules T spécifiques contre cet antigène [179].

La dégradation antigénique et l'expression peptidique sur les molécules du CMH des CPA s'effectue de façon intracellulaire dans les CPA. Les peptides proviennent de la protéolyse des protéines microbiennes ou des cellules tumorales soit dans le cytosol par le protéasome ou dans la voie endocytique par les protéases lysosomiales [180]. Les cellules T CD4+ et T CD8+ reconnaissent les peptides associés aux molécules du CMH de classe II et I respectivement [180]. Les peptides présentés par les molécules du CMH de classe I dérivent généralement de protéines virales ou de protéines du soi dégradées dans le cytosol. Ces peptides sont transportés dans le réticulum endoplasmique par les transporteurs peptidiques TAP (Transporter associated with antigen processing) et associés aux molécules du CMH sous le contrôle d'un complexe de chaperons dans le réticulum endoplasmique [182]. Lorsque les molécules du CMH de classe I sont associées aux peptides, ce complexe est rapidement transféré par l'appareil de Golgi à la membrane pour ainsi, être reconnu par les cellules T CD8+ [182]. Pour sa part, le CMH de classe II expose essentiellement des peptides dérivés d'antigènes présents dans la voie endocytique, c'est-à-dire, des protéines internalisées ou membranaires [180]. Les molécules du CMH de classe II

présentent des peptides par une voie différente de celle des molécules du CMH de classe I. Trois dimères α/β CMH de classe II s'associent à un trimère de chaînes invariables Ii. Ce complexe sort du réticulum endoplasmique et passe au travers l'appareil de Golgi pour être transporté dans la voie endocytyque. Dans la voie endocytyque, ce complexe rencontre un environnement acide et riche en protéase qui va permettre la dégradation des chaînes invariables Ii par les protéases du milieu [183, 184]. Ce dimère peut maintenant lier les peptides sous le contrôle de deux molécules non polymorphiques de CMH de classe II soit, HLA-DM et HLA-DO. Par la suite, le complexe CMH classe II / peptide rejoint la membrane pour ainsi être reconnu par les cellules T CD4+ [185].

Il est également à mentionner qu'outre les molécules du CMH de classe I et II, les cellules dendritiques expriment une autre classe de molécule pouvant exposer des peptides antigéniques soit les protéines CD1. Chez l'humain, cinq gènes encodant leur protéine respective sont connus soit, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e [186]. Les molécules CD1 lient les antigènes glycolipidiques ou dérivant d'origine endogène et exogène pour activer les cellules autant T CD8+, T CD4-CD8- et $\gamma\delta$ T [187].

1.6.2.2 L'activation et la différenciation des lymphocytes T

La maturation des CPA survenant suite à la reconnaissance d'un antigène est associée à une migration de ces cellules dans les zones de cellules T dans les organes lymphoïdes secondaires. Cette maturation permet l'augmentation de molécules d'adhésion et de molécules de costimulation à la surface cellulaire comme les molécules B7.1 et B7.2 [180]. Ces molécules s'associent aux molécules CD28 et CTLA-4 sur les cellules T ce qui a comme effet d'augmenter l'habilité des CPA à activer les cellules T [180]. Les molécules de costimulation B7-H1 et B7-DC s'associent avec la molécule PD-1 sur les cellules T ce qui favorise la production des cytokines IFN γ , IL-2 et IL-10 [188, 189]. La molécule

de costimulation 4-1BB sur les cellules T s'associe avec 4-1BBL sur les CPA est permet l'activation des cellules T CD8+ [190]. Pour sa part, la molécule OX40 sur les cellules T qui s'associe avec OX40L sur les CPA mène à la différenciation des cellules T CD4+ [191]. Cette adhésion entre les CPA et les cellules T ainsi que la production de cytokines favorise la prolifération des cellules T [189].

Différents facteurs influencent le développement des cellules T CD4+ activées vers des cellules Th1 ou Th2. Par exemple, les CPA stimulées par IFN γ , LPS, CpG oligonucléotides ou ARN double-brin produisent une grande quantité de IL-12 et par le fait même, favorise une différenciation en cellules Th1 [192, 193]. La PGE2 favorise plutôt la maturation de CPA non-productrices de IL-12 et induit donc la différenciation en cellules Th2 [194]. Le type de pathogène joue également un rôle important dans la différenciation des cellules CD4+ vers un profil Th1 ou Th2 [195]. Par ailleurs, l'origine des CPA influence le type de différenciation des cellules CD4+. Par exemple, les cellules provenant des plaques de Peyer produisent surtout IL-4 et IL-10 ce qui a comme conséquence de favoriser un profil de cellules de type Th2 [196].

Les lymphocytes Th1 produisent les cytokines IFN γ , IL-2 et TNF α conférant ainsi à ces cellules des rôles essentiellement dans l'activation des macrophages, dans la cytotoxicité cellulaire et dans l'induction d'immunité à médiation cellulaire [197]. Pour leur part, les lymphocytes Th2 produisent les cytokines IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 et IL-13, qui permettent à ces cellules Th2 de remplir des rôles essentiellement dans la réponse anticorps, la production d'IgE, favorisent l'activation et la différenciation des éosinophiles et inhibent les fonctions macrophagiques [197]. Les lymphocytes Th2 possèdent un rôle essentiel, celui d'induire le développement d'anticorps. Ces lymphocytes spécifiques d'un antigène interagissent avec les cellules B également spécifiques pour l'antigène dans les organes lymphoïdes pour ainsi, activer ces cellules B à produire des anticorps. Cette reconnaissance entre la cellule T et la cellule B se fait via le complexe CMH de classe II : peptide sur la cellule B et est souvent

nécessaire à une production d'anticorps spécifiques abondantes. Les cellules ainsi activées peuvent se différencier en plasmocytes sécrétant des anticorps ou en cellules B mémoires. La différenciation des cellules B en plasmocytes sécrétant des anticorps nécessite la sécrétion des cytokines IL-5 et IL-6 par les cellules T [173].

Les lymphocytes T CD8+ (cellules T cytotoxiques) sont activées suite à la reconnaissance des molécules du CMH de classe I afin de permettre une défense contre les virus et bactéries qui se développent dans le cytoplasme de la cellule [180]. Les cellules T cytotoxiques peuvent induire la mort cellulaire par apoptose de la cellule infectée soit en dégradant l'ADN de la cellule ou en favorisant une perte de l'intégrité membranaire. Les cellules T cytotoxiques libèrent de la perforine permettant la formation de pores traversant la surface membranaire de la cellule infectée. Par la suite, la libération d'enzymes de la famille des sérines-protéases, les granzymes, permettent la dégradation de l'ADN de la cellule [198]. Les cellules T cytotoxiques permettent aussi de déclencher l'apoptose des cellules infectées via la liaison de FasL au Fas sur les cellules infectées. Ces cellules en apoptose seront ainsi éliminées par les cellules phagocytaires [198]. Les lymphocytes T cytotoxiques libèrent également des cytokines permettant ainsi, l'activation d'autres cellules immunitaires. Ils sécrètent de l'IFN γ qui augmente l'expression de molécules du CMH de classe I permettant une meilleure reconnaissance des cellules infectées. L'IFN γ permet également l'activation du macrophage qui pourra ainsi effectuer une phagocytose plus efficace.

1.6.2.3 Le développement de la réponse mémoire

La réponse immune adaptative permet également de développer une réponse mémoire essentielle à une défense subséquente plus rapide des agents pathogènes préalablement rencontrés. Les lymphocytes T ainsi que les lymphocytes B sont tous deux impliqués dans la réponse mémoire. Comme mentionné précédemment,

les cellules B activées se différencient soit en plasmocytes ou en cellules B mémoires. Les cellules B mémoires répondent beaucoup plus facilement à l'antigène et les anticorps produits ont généralement une affinité supérieure pour l'antigène. La réponse anticorps primaire repose essentiellement sur la production d'anticorps de type IgM alors que les réponses anticorps subséquentes sont plutôt médiées par la production d'IgG. Effectivement, les cellules B mémoires expriment en surface des IgG, des IgA ou des IgE ainsi qu'un plus grand nombre de molécules du CMH de classe II ce qui facilite la capture et la présentation de ces antigènes par les cellules B mémoires et ainsi, permet une interaction avec des cellules T auxiliaires de façon plus rapide et à plus faible dose d'antigènes [173]. Pour leur part, les lymphocytes T sont normalement éliminés à la fin de la réponse immunitaire primaire. Cependant, une petite proportion de ces cellules T survivent et deviennent des cellules T mémoires. La production de diverses cytokines semblent être impliquée dans le processus de la réponse mémoire. La production des cytokines IFN γ et IL-2 favorise l'apoptose des cellules T alors que la production de IL-7 et IL-15 favorise la survie cellulaire et donc, le développement de cellules T mémoires [199]. Il existe deux types de cellules T mémoires; un premier type ressemble davantage à des cellules T effectrices, exprimant des marqueurs d'activation tel le CD69 et le CD25, et étant caractérisé par un potentiel à rapidement devenir activé et à démontrer des activités cytotoxiques, dans le cas des cellules T CD8+ [200-202]. Ces cellules expriment également des récepteurs de chimiokines et des intégrines leur permettant de pouvoir entrer dans les tissus non-lymphoïdes [202, 203]. Le deuxième type de cellules T mémoires est des cellules résidentes possédant peu de marqueurs d'activation, ayant une capacité plus lente à réagir aux pathogènes et ayant une distribution dans les tissus lymphoïdes ressemblant davantage à celle des cellules T naïves [202]. Ces cellules T mémoires expriment notamment les récepteurs CD62L et CCR7 leur permettant d'entrer via l'endothélium dans les ganglions lymphatiques [202]. Les cellules T mémoires peuvent plus rapidement produire des cytokines, se différencier en CTL et migrer dans les tissus lymphoïdes; leur

activation est également moins dépendante d'une costimulation que l'activation des cellules T naïves [199, 200, 204, 205].

1.6.3 Étapes clés lors du développement de la réponse immunitaire

1.6.3.1 La production de cytokines et chimiokines

La reconnaissance d'agents étrangers mène à la production de diverses cytokines par les cellules dont le rôle est d'attirer et d'activer d'autres cellules à effectuer la défense immunitaire. Le profil des principales cytokines, étant les médiateurs des réactions immunitaires subséquentes, ainsi que leur rôle est rapporté au tableau 6. Les premières cytokines produites sont celles de la phase aiguë, soit IL-1 β , IL-6 et TNF α . Ces cytokines activent les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules NK [173]. Elles augmentent aussi la perméabilité de l'endothélium permettant ainsi l'extravasation des leucocytes dans les tissus. Le TNF α agit également de façon autocrine sur les macrophages afin d'augmenter leurs fonctions biologiques dont la phagocytose [206].

En second lieu, il y a production de cytokines plus spécifiques afin de déterminer le type de cellules activées et ainsi, déterminer le profil de la réaction immunitaire subséquente. Il y a production de IL-12 dont l'objectif est d'activer les cellules T CD4+ en un phénotype de type Th1 [207]. Le développement d'un profil de type Th1 permet l'activation des CPA et en particulier, des macrophages via la sécrétion d'IFN γ . Cette activation des leucocytes permet d'amplifier la réponse immunitaire et mène à une réponse adaptative via l'activation des cellules T [207]. La production de IL-12 en synergie avec la production de IL-18 permet également une réponse anti-virale via l'action des cellules NK [208].

D'un autre côté, la production de IL-10 mène plutôt à l'activation des cellules B à produire des anticorps et inhibe l'activité des CPA et l'activation des lymphocytes Th1. La production de IL-10 favorise un phénotype Th2 et induit la

sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles IL-4, IL-5 et IL-13 par les lymphocytes Th2 [209].

Pour leur part, les chimiokines ont comme rôle principal, d'attirer les leucocytes dans un site inflammatoire [210]. Elles sont divisées en trois familles regroupées selon la position et le nombre de cystéines les composants; C, CC et CXC. Généralement, les chimiokines de la classe CXC recrutent essentiellement les neutrophiles alors que celles de la classe CC attirent les monocytes, macrophages, lymphocytes, basophiles et éosinophiles [211, 212]. La classe C regroupe seulement une chimiokine, la lymphotactine, qui est impliquée dans le recrutement des lymphocytes [213].

Les macrophages produisent des chimiokines autant de la classe CXC donc permettant d'attirer les neutrophiles mais aussi de la classe CC afin de recruter plus de monocytes/macrophages dans un site inflammatoire. Ils vont surtout produire MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein-2) et IL-8 (ou KC, étant l'équivalent chez la souris) dans la classe des chimiokines CXC [214-218]. Dans la classe de chimiokines CC, les macrophages vont essentiellement produire MIP-1 α , MIP-1 β et MCP (Monocyte Chemoattractant Protein) [219-222].

Les neutrophiles, tout comme les macrophages, produisent également des chimiokines de la classe CXC et en particulier, IL-8/KC et GRO α afin d'attirer un plus grand nombre de neutrophiles dans un site inflammatoire [223, 224]. Ils induisent aussi l'extravasation des monocytes/macrophages via la production des chimiokines de la classe CC soit; MIP-1 α et MIP-1 β [224, 225].

TABEAU 6. PROFIL DES PRINCIPALES CYTOKINES PRODUITES.

Cytokine	Produit par :	Profil	Fonctions
IL-1α IL-1β	Macrophages Monocytes Cellules dendritiques	Th1	Réponse inflammatoire contre les infections Augmente l'expression des facteurs d'adhésion
IL-2	Lymphocytes Tauxilliaires	Th0	Développement cellules T mémoires Augmente la différenciation des cellules CTL spécifiques
IL-4	Tauxilliaires Th2	Th2	Activation des cellules B et T Régulateur de l'immunité humorale et adaptative Différenciation des cellules B en IgE Augmente la production de CMH II
IL-5	Tauxilliaires Th2 mastocytes	Th2	Augmente la production de cellules B et la production d'immunoglobulines Activation des éosinophiles
IL-6	Macrophages Lymphocytes T	Th1	Méiateur important de la fièvre et de la réponse inflammatoire aiguë
IL-10	Th2, cellules B, macrophages	Th3 Th2	Inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires
IL-12	Macrophages Cellules dendritiques	Th1	Différenciation des cellules T Aide les actions des cellules T, NK et CTL
IL-13	Cellules Th2	Th2	Méiateurs de réactions allergiques Propriétés anti-inflammatoires
IL-17	CD4+CD45RO+	Th1	Effet immunitaire très diversifié dû au nombre élevé de type de IL-17 Pro-inflammatoire et pro-allergène Augmente la production de cytokines et de la PGE2
IL-18	macrophages	Th1	Augmente l'activité et la production de cellules NK (synergie avec IL-12)
IL-23	Cellules T Cellules NK Monocytes Cellules dendritiques	Th1	Réponse inflammatoire contre les infections Diminue l'infiltration des CD8+ Stimule la différenciation de CD4+ en cellules CD4+ Th17 (produit IL-17)
IL-27	CPA	Th1	Régule l'activité des cellules T et B Différenciation en Th1
TNFα	Leucocytes Cellules endothéliales	Th1	Déclenchement de l'inflammation Associé à plusieurs maladies autoimmunes
IFNγ	Lymphocytes T et cellules NK	Th1	Propriétés anti-virales et anti-tumorales. Active les CPA

1.6.3.2 L'extravasation

L'extravasation est le processus par lequel les leucocytes migrent dans un tissu suite à une attraction par la production de cytokines et chimiokines. L'extravasation se fait via l'interaction des molécules d'adhésion à la surface des leucocytes avec leurs récepteurs sur les cellules endothéliales. Ces molécules d'adhésion se divisent en trois familles, illustrées au tableau 7, soit les sélectines, les intégrines et certaines immunoglobulines [226-229].

Les sélectines sont essentiellement impliquées dans la première étape de l'extravasation soit l'adhésion primaire des leucocytes aux cellules endothéliales [230]. L'expression des sélectines est stimulée par la présence de bactéries, de toxines et surtout, par la production de cytokines et chimiokines. La partie lectine des sélectines se fixe aux glycanes possédant des structures spécifiques de type sialyl-Lewis^x [230-234]. Cette interaction est dépendante de la présence du calcium. La L-sélectine sert aussi de ligand pour les E- et P-sélectines [235]. Cette interaction est faible et se dissocie et se réassocie constamment permettant ainsi le roulement des leucocytes sur les cellules endothéliales [236, 237]. Par la suite, les leucocytes sont exposés à des chimioattractants et des médiateurs inflammatoires.

La deuxième étape de l'extravasation est l'adhérence et fait intervenir les intégrines. Elle est le résultat de l'attachement de ces dernières avec leur co-récepteur sur les cellules endothéliales. Les intégrines sont des protéines hétérodimériques composées d'une chaîne α et une chaîne β . Suite à une stimulation inflammatoire, elles sont rapidement exprimées et mobilisées à la surface cellulaire menant à une réduction de l'expression des sélectines [227]. Les ligands spécifiques des intégrines sont des molécules de surface de la famille des immunoglobulines [238, 239] ou des protéines de la matrice extracellulaire telle la fibronectine, la vitronectine, le fibrinogène et des composants du

complément [240-242]. Cette liaison, très spécifique, se traduit par une adhésion beaucoup plus forte des leucocytes aux cellules endothéliales.

La migration des leucocytes, aussi appelée diapédèse, est la dernière étape du processus d'extravasation et débute avec le mouvement des leucocytes adhérents via les jonctions endothéliales cellulaires. Durant cette étape, de nouvelles interactions se produisent au devant des cellules migrantes avec la jonction membranaire et il y a ainsi, réduction de l'adhésion à la queue de la cellule afin de favoriser la diapédèse. Ces interactions se font principalement via PECAM-1 [243].

TABLEAU 7. PRINCIPALES MOLÉCULES D'ADHÉSION IMPLIQUÉES DANS L'EXTRAVASATION

Types	Leucocytes	Cellules endothéliales	Rôles
Sélectine	L-sélectine	E-sélectine P-sélectine	Roulement des leucocytes sur cellules endothéliales
Intégrine Immunoglobuline	LFA-1 VLA-4 MAC-1	ICAM-1 ICAM-2 ICAM-3 VCAM-1	Adhésion forte des leucocytes aux cellules endothéliales
Immunoglobuline	PECAM-1 HCAM	PECAM-1 MadCAM-1	Adhésion forte Migration transendothéliale

1.6.3.3 La phagocytose

La phagocytose est un mécanisme de défense immunitaire essentiel à l'organisme. Une des fonctions les plus connues de la phagocytose est la défense contre les corps étrangers résidant dans l'organisme. Cependant, ce mécanisme est aussi très important pour la destruction des cellules immunitaires défectueuses ou en apoptose, ce qui permet d'éviter le relâchement de substances

potentiellement toxiques se retrouvant à l'intérieur des cellules qui peuvent détruire les tissus de l'organisme.

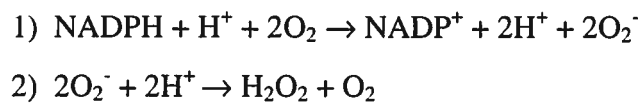
Tel que mentionné précédemment, les cellules phagocytaires possèdent des PAMP, ces récepteurs de surface reconnaissant des motifs hautement conservés à la surface des pathogènes [168, 169, 244]. Ces derniers peuvent aussi avoir été préalablement reconnu lors d'une réaction humorale et conséquemment, être recouvert de molécules du complément ou d'IgG [245]. La liaison du pathogène à la surface de la cellule enclanche la transduction de signaux qui mènent à la polymérisation de l'actine favorisant la formation de pseudopodes pour englober la particule à ingérer. Suite à l'ingestion, la dépolymérisation de l'actine mène à la formation du phagosome qui pénètre la membrane cellulaire. Le phagosome se fusionne par la suite à diverses vésicules comme les endosomes et les lysosomes pour former le phagolysosome. Les enzymes hydrolytiques amenés par les lysosomes dans le phagolysosome veillent à la destruction du pathogène [173]. Ces leucocytes, via leur rôle de CPA, présenteront des divers peptides générés par l'hydrolyse du pathogène à la surface de la cellule par les molécules du CMH pour activer ainsi les lymphocytes.

1.6.3.4 La production de dérivés de l'oxygène et de l'azote

La phagocytose est le mécanisme impliqué dans la reconnaissance et l'ingestion des corps étrangers. Par contre, la destruction des micro-organismes dans le phagolysosome se fait via ses enzymes hydrolytiques (constituant des lysosomes), ainsi que par la production de dérivés de l'oxygène, les ROS (Reactive Oxygen Species) et les dérivés de l'azote, les RNOS (Reactive Nitrogen Species) [173]. La production de ses dérivés se fait principalement, via l'activité des enzymes NADPH oxydase et NO synthase (Nitric Oxide Synthase) [246, 247]. Les ROS et RNOS sont généralement considérés comme étant indispensables à la défense primaire contre les invasions pathogéniques.

Cependant, ils sont également impliqués dans la régulation de l'homéostasie cellulaire, la prolifération cellulaire et conséquemment, dans la régulation des réactions immunes et inflammatoires [248, 249].

La NADPH oxydase est rapidement activée par divers médiateurs tels les chimiokines et les complexes immuns qui vont interagir avec les récepteurs membranaires à la surface des cellules. Une fois activée, la NADPH oxydase génère une très grande quantité de ROS [250]. Cette enzyme utilise la NADPH pour générer le produit final majeur, l'anion superoxide (O_2^-) provoquant ensuite la génération (H_2O_2) hautement toxique selon ces réactions :



En plus de ces deux ROS majeurs, il y a génération de radicaux hydroxyl (OH) et d'acide hypochloreux (HOCl) principalement par la myéloperoxidase, une enzyme très importante retrouvée dans les granules des neutrophiles [251, 252]. Tous ces composés de l'oxygène sont relâchés dans les phagosomes et oxydent les lipides et protéines microbiennes. Ces dérivés peuvent être relargués dans le milieu extracellulaire, d'où les dommages tissulaires observés dans des circonstances pathologiques ou extrêmes [253].

La génération de RNOS via la NO synthase dérive de la conversion de la L-arginine en L-citrulline. Les RNOS se classent en deux catégories, les NO synthases constitutives et les NO synthases inducibles. Les NO synthases constitutives (NOS1 et NOS3) sont dépendantes du Ca^{2+} alors que les NO synthases inducibles (iNOS) sont induites via la présence de cytokines et de stimuli inflammatoires et sont indépendantes du Ca^{2+} . Le principal RNOS produit est le NO qui est reconnu pour posséder des effets pro-inflammatoires mais aussi anti-inflammatoires. Paradoxalement, le NO inhibe l'adhésion des leucocytes mais est aussi très présent dans les maladies autoimmunes [254-256].

Le NO interagit avec le O_2^- pour former du peroxy-nitrite ($ONOO^-$) qui serait impliqué dans la réduction de l'adhésion des leucocytes [255, 257].

Le métabolisme de l'acide arachidonique via les cyclooxygénases (COX) et les lipoxygénases (LOX) permet aussi la génération de molécules particulièrement importantes dans les réactions inflammatoires. Les COX génèrent de l'hydroxyperoxy endoperoxide (PGG_2) en incorporant de l'oxygène dans l'acide arachidonique. Le PGG_2 est converti ensuite par les hydroperoxidases en prostaglandine H_2 (PGH_2), le précurseur des prostaglandines [258]. Les prostaglandines possèdent un rôle important lors de la vasoconstriction et de l'aggrégation des plaquettes [258]. L'acide arachidonique est converti par l'enzyme 5-lipoxygénase (LOX-5) via l'insertion d'oxygène en leukotriène A4, précurseur des leukotriènes [259]. Les leukotriènes sont chimioattractants pour les neutrophiles et sont particulièrement impliqués dans les réactions asthmatiques et les allergies [260]. Les leukotriènes augmentent également la production de cytokines et la génération de ROS par les leucocytes [261].

1.6.4 La réaction inflammatoire

L'inflammation est une réponse de l'organisme face aux infections et aux dommages tissulaires. Cette manifestation de l'hôte peut être bénéfique lors d'une défense contre les pathogènes invasifs; ou alors, elle peut être dommageable comme c'est le cas lors d'une maladie auto-immune. Son rôle principal est de permettre l'arrivée des médiateurs, protéines et cellules immunitaires dans un tissu infecté ou subissant un stress physique, mécanique ou chimique. Durant la réponse inflammatoire, les mécanismes impliqués autant dans l'immunité innée qu'adaptive ont des rôles importants à jouer.

L'inflammation est caractérisée par quatre signes cliniques résultant de l'augmentation du volume sanguin et de l'infiltration de cellules inflammatoires

dans les tissus. Ces signes sont la chaleur, la rougeur, la douleur et l'enflure [262]. Ils sont le résultat d'une augmentation du diamètre des vaisseaux sanguins permettant une augmentation du volume sanguin circulant et une réduction de la vitesse du flux sanguin [173].

La réaction inflammatoire est divisée en cinq étapes majeures caractérisant la réaction inflammatoire aiguë, la réaction inflammatoire chronique et la résolution de l'inflammation. Le tableau 8 résume ces étapes qui seront décrites dans les sections subséquentes.

TABLEAU 8. ÉTAPES DE LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE

Réaction inflammatoire	Étape	Caractéristiques
Aiguë	Vasodilatation Vasoperméabilité	Augmentation de la perméabilité vasculaire causant l'augmentation du volume sanguin
Aiguë	Infiltration des neutrophiles	Élimination de l'agent infectieux, des débris cellulaires et production de cytokines
Aiguë et Chronique	Infiltration des macrophages et lymphocytes	Élimination plus efficace de l'agent infectieux et des débris cellulaires
Chronique	Résolution	Restauration de la structure normale du tissu
Chronique	Cicatrisation	Reconstruction du tissu par les fibroblastes et le collagène

1.6.4.1 La réaction inflammatoire aiguë

La fonction principale de la réaction inflammatoire aiguë est de permettre la réponse vasculaire, résultat de la vasodilatation, qui survient très rapidement suite au dommage tissulaire. Il y a augmentation de la perméabilité vasculaire causant des altérations dans l'endothélium ce qui augmente le volume sanguin entrant dans le tissu. L'augmentation du volume sanguin permet de diluer les molécules toxiques s'accumulant dans le tissu et d'augmenter la circulation

lymphatique. La réponse cellulaire aiguë survient dans les minutes suivantes et est caractérisée par la migration des leucocytes, principalement des neutrophiles, et des protéines cellulaires dans le tissu. L'augmentation du volume sanguin mène à l'adhésion des neutrophiles sur les cellules endothéliales permettant par la suite, le passage des neutrophiles dans le tissu adjacent. Les neutrophiles sont attirés et activés dans le tissu par les facteurs chimiotactiques, ce qui permet la destruction de l'agent infectieux, l'élimination des débris cellulaires et la production des cytokines nécessaires aux réactions subséquentes. Les neutrophiles sont responsables de la nécrose tissulaire par la libération des enzymes lysosomiales [263].

L'infiltration des neutrophiles est suivie par l'infiltration des cellules mononuclées soit, les lymphocytes et les macrophages. Les macrophages sont également activés par les facteurs chimiotactiques et sont responsables de l'élimination des agents infectieux et des débris tissulaires restants, ainsi que de l'élimination des neutrophiles nécrotiques ou apoptotiques. Si l'infection est éliminée et que les dommages tissulaires sont minimes, les macrophages peuvent permettre la résolution de l'inflammation et ainsi, le retour à la structure normale du tissu.

1.6.4.2 Les cellules de la réaction inflammatoire aiguë

Mastocytes et basophiles

Les mastocytes dans les tissus et les basophiles du sang sont responsables de la première étape de la réaction inflammatoire soit, l'augmentation de la perméabilité vasculaire [264]. La dégranulation de ces cellules permet le relâchement de l'histamine et la sérotonine causant la contraction des cellules endothéliales et la vasodilatation [264, 265]. Les métabolites dérivant du métabolisme de l'acide arachidonique, les prostaglandines et les leukotriènes, sont les principaux médiateurs des réactions inflammatoires. Or, l'acide arachidonique

provient de la dégradation des phospholipides membranaires, relâchés des mastocytes lors de la réaction inflammatoire aiguë, par des phospholipases [265].

Les prostaglandines dérivent de la voie de la cyclooxygénase caractérisée par l'oxydation de l'acide prostanoïque. Les différentes prostaglandines sont caractérisées par différentes liaisons non-saturées. Les prostaglandines PGE2 et PGD2 sont les plus importantes pour la réaction inflammatoire; elles provoquent la vasodilatation et la perméabilité vasculaire [258].

Pour leur part, les leukotriènes dérivent de la voie de la lipoxygénase et sont générés par les mastocytes et la plupart des leucocytes [266]. Les leukotriènes sont chimiotactiques pour les éosinophiles et les neutrophiles. Ils favorisent l'adhésion des neutrophiles, leur dégranulation ainsi que la génération de ROS [260].

Les mastocytes et les basophiles sécrètent différentes cytokines dont IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF, TNF α et IFN γ . Ce profil de sécrétion de cytokines par les mastocytes est plutôt impliqué dans des réactions anaphylaxiques en favorisant la différenciation des cellules CD4+ en cellules Th2 ainsi que la production d'IgE par les cellules B [263].

Neutrophiles

Les neutrophiles sont les cellules majeures de la réaction inflammatoire aiguë et sont également les cellules sanguines les plus abondantes constituant de 50 à 70% des leucocytes sanguins [267]. Les facteurs de croissance hématopoïétiques GM-CSF, G-CSF (Granulocytes Colony Stimulating Factor) et M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) ainsi que la cytokine IL-3, également appelée multi-CSF (Multi Colony Stimulating Factor), ont pour rôle d'induire la production et la différenciation des neutrophiles dans la moëlle osseuse [268].

Les neutrophiles sont attirés au site inflammatoire par de nombreux facteurs chimiotactiques dont, les composants du complément (surtout la protéine C5a), le leukotriène B4 et IL-8. La stimulation par ces facteurs chimiotactiques permettent aux neutrophiles de migrer au site inflammatoire, d'effectuer la phagocytose, de sécréter le contenu de leur granules et d'activer le système de la NADPH oxydase pour générer des ROS [269].

Plusieurs molécules d'adhésion sont impliquées dans la migration des neutrophiles au site inflammatoire (tableau 7). Elles sont responsables de l'interaction neutrophiles-cellules endothéliales. L'expression de ces molécules d'adhésion est augmentée lors d'une réaction inflammatoire permettant ainsi, l'augmentation de la quantité de cellules immunitaires au site inflammatoire [270].

De plus, les neutrophiles sont également constitués de lysosomes. Ces vésicules sont importantes dans les fonctions des neutrophiles en leur permettant de détruire les pathogènes ingérées et de réguler différents processus physiologiques et pathologiques. Les principales enzymes présentes dans ces lysosomes sont la myéloperoxydase, la lactoferrine, le lysozyme, la collagénase et certaines défensines [271-274]. La myéloperoxydase (MPO) est impliquée dans la conversion du peroxyde d'hydrogène en acide hypochloreux, un des composés antimicrobiens les plus puissants [275, 276]. Pour sa part, la lactoferrine séquestre le fer afin de prévenir la croissance des organismes ingérés [277]. Les défensines sont de petites molécules possédant des effets cytotoxiques sur une large variété de micro-organismes [274, 278]. Donc, le rôle majeur des neutrophiles est la destruction des pathogènes par un processus de phagocytose et de protéolyse via le relâchement des enzymes présentes dans les lysosomes.

Éosinophiles

Les éosinophiles sont retrouvés dans deux types d'inflammation aiguë, les allergies et la défense parasitaire. Ces cellules réagissent à des facteurs

chimiotactiques spécifiques tel l'histamine, le facteur chimiotactique d'éosinophile A, le promoteur de stimulation d'éosinophile et des extraits de parasites. L'activation des éosinophiles est associée à une vasoconstriction intense de certains tissus, en particulier le poumon. La vasoconstriction du poumon mène ensuite à l'augmentation de la perméabilité vasculaire créant l'œdème pulmonaire [279]. La peroxidase de l'éosinophile, la MBP (Major Basic Protein) et la EDN (la neurotoxine-dérivée de l'éosinophile) constituent 90% du contenu des granules des éosinophiles [279]. Ces protéines sont responsables du syndrome de détresse respiratoire associé au choc anaphylactique en augmentant les fluides et les cellules dans l'espace alvéolaire à travers des dommages causés directement aux cellules endothéliales [263]. Les molécules d'adhésion des éosinophiles sont similaires à celle des neutrophiles. Cependant, une adhésion de haute affinité est spécifique aux éosinophiles et survient après la production de IL-4 qui active l'expression de VCAM-1 sur les cellules endothéliales qui s'associe ensuite avec l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) sur l'éosinophile. Les neutrophiles ne peuvent adhérer aux cellules endothéliales dans ces conditions [263].

1.6.4.3 Le rôle de la voie du complément dans la réaction inflammatoire aiguë

La voie du complément fait intervenir plus de vingt protéines sériques menant à la production de molécules activées qui amplifient les réactions inflammatoires. L'activation du complément se fait via deux voies distinctes : la voie d'activation classique initiée par des réactions anticorps-antigène et la voie d'activation alternative initiée par certaines composantes bactériennes. L'activation se fait à la surface des cellules et implique de nombreuses interactions moléculaires menant à la formation de fragments et complexes de protéines actifs. Les fragments du complément sont relâchés permettant de stimuler de nombreuses fonctions inflammatoires dont la chimiotaxie des

leucocytes, l'augmentation de la phagocytose et l'augmentation de la perméabilité vasculaire [280].

Voie classique d'activation du complément

La voie classique d'activation du complément débute par la liaison de la molécule C1 sur un anticorps à la surface cellulaire. La molécule C1 peut lier un anticorps de type IgM ou deux anticorps de type IgG suffisamment rapprochés pour être reconnu par C1. Donc, les anticorps de type IgM sont beaucoup plus efficace pour activer la voie classique du complément. Une fois C1 attaché sur une molécule d'anticorps, il s'active et peut dissocier les molécules du complément C2 et C4 en deux fragments (C2a et C2b, C4a et C4b). Les fragments C4a et C2b sont relâchés et possèdent des activités inflammatoires alors que les fragments C2a et C4b s'associent ensemble formant une enzyme appelée C3 convertase. La C3 convertase permet également la génération de deux fragments soit C3a et C3b dérivant de la molécule C3. Le fragment C3a est relâché et possède des activités anaphylaxiques alors que C3b s'associe à C2aC4b devenant l'enzyme C5 convertase générant les fragments C5a et C5b. Pour sa part, le fragment C5b se lie à la surface cellulaire alors que C5a est relâché et possède des activités anaphylaxiques et chimiotactiques importantes pour la réaction inflammatoire aiguë. La liaison de C5b à la surface permet de créer un complexe moléculaire avec les molécules C6, C7, C8 et C9. Ce complexe moléculaire est responsable de la formation d'un canal à la surface membranaire permettant la lyse cellulaire.

Voie alternative d'activation du complément

Cette voie alternative est activée par des molécules microbiennes ou autres tel le LPS, le zymosan ou des IgA. Le facteur d'initiation, le facteur B et le facteur D interagissent entre eux comme le font les molécules C1, C2 et C4 de la voie classique pour former un complexe agissant comme l'enzyme C3 convertase formant ainsi le complexe Bb, D et C3b. La properdine va ensuite s'associer créant un complexe agissant comme la C5 convertase. Ce dernier interagit avec la

C5 de la voie classique permettant de rejoindre ainsi les étapes de la voie classique d'activation du complément.

1.6.4.4 La réaction inflammatoire chronique

La réponse cellulaire chronique survient dans les jours suivants si l'infection ou le dommage tissulaire est plus sévère et ne peut être contrôlé par la réponse aiguë. Elle est caractérisée par la migration plus importante dans le tissu des monocytes/macrophages et des lymphocytes. Les macrophages permettent ainsi, la destruction microbienne efficace et la disparition des débris cellulaires et tissulaires permettant d'initier la phase de résolution de la réaction inflammatoire. La résolution survient dans les jours et semaines suivants et est caractérisée par la restauration et la cicatrisation du tissu.

Les cytokines possèdent un rôle essentiel dans le développement et l'amplification de la réponse inflammatoire. Parmi les cytokines les plus importantes dans la réaction inflammatoire chronique, notons, IL-1, IFN γ , TNF, IL-2 et TGF- β .

IL-1

L'IL-1 comprend trois gènes portés par le chromosome 2 et qui présentent de nombreuses homologies : IL-1 α , IL-1 β et IL-1 Ra (Interleukin-1 Receptor Antagonist). Ces 3 protéines se fixent sur le récepteur de l'IL-1. La protéine IL-1 Ra ne se fixe que sur la partie IL-1 RI du récepteur et empêche alors l'activation du signal intra-cellulaire, ce qui bloque les effets de IL-1 [281].

Les deux cytokines, IL-1 α et IL-1 β , possèdent des rôles similaires et sont produits par les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules T et B et les cellules endothéliales. Son rôle dans l'inflammation est relié à la stimulation de la

production de nombreuses autres cytokines dont les facteurs de différenciation G-CSF et GM-CSF. Son interaction avec ces facteurs de différenciation favorise la production de cellules inflammatoires par la moëlle osseuse. IL-1 induit la fièvre, la léthargie et stimule la production de PGE2 contribuant ainsi à l'amplification de la réaction inflammatoire mais surtout, aux symptômes associés à l'inflammation.

IFN γ

L'IFN γ est produit par les lymphocytes et les cellules NK afin d'attirer et d'activer les macrophages. Il permet d'augmenter l'expression de récepteurs à la surface cellulaire et de favoriser la production de d'autres cytokines inflammatoires dont IL-1 et TNF. Il synergise avec de nombreuses cytokines inflammatoires afin d'amplifier la réaction inflammatoire chronique [282].

TNF

La famille du TNF possède deux membres majeurs impliqués dans les réactions inflammatoires soit, TNF- α et TNF- β . Leurs rôles sont diversifiés mais les plus importants dans les réactions inflammatoires sont, la stimulation de l'expression de molécule du CMH de classe I sur les fibroblastes et les cellules endothéliales, la synergie avec l'IFN γ afin de stimuler l'expression des molécules du CMH de classe II sur plusieurs cellules immunitaires, favoriser l'activation des macrophages et la production de IL-1. Le TNF provoque la fièvre, l'hypotension et la cachexie.

IL-2

IL-2 est produit par les lymphocytes T activés et une petite proportion de cellules B activées. Il agit de façon autocrine afin de favoriser la prolifération des lymphocytes T ou B. Son rôle majeur dans l'inflammation est indirect et concerne essentiellement l'augmentation de la production de IL-1 et IFN γ . IL-2 agira aussi sur le macrophage afin de favoriser sa cytotoxicité.

TGF- β

Trois isoformes de TGF- β sont présents chez l'humain, le TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3. Le TGF- β 1 est produit par les macrophages, les cellules T et B, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Le TGF- β 1 est chimiotactique pour les leucocytes, contrôle la production de cytokines et possède un rôle majeur dans la résolution et la réparation du tissu [283]. Il agit de façon autocrine afin de favoriser sa propre production et la cicatrisation des tissus.

Les chimiokines possèdent également de nombreux rôles dans la réaction inflammatoire chronique. Il existe quatre groupes de chimiokines soit *i*) β -chimiokines (CC), *ii*) α -chimiokines (CXC), *iii*) γ -chimiokines (C) et *iv*) fractaline et neurotactine (CX₃C) [284]. Les chimiokines permettent d'attirer les lymphocytes, les monocytes et/ou les neutrophiles [284]. Elles ne favorisent pas la production de cytokines mais plutôt la production d'histamine, dans le cas des chimiokines favorisant les réactions allergiques, et de défensines. Cette production d'histamine et de défensines a pour rôle d'augmenter l'attraction de cellules inflammatoires [263].

1.6.4.5 Les cellules de la réaction inflammatoire chronique

Lymphocytes

Les lymphocytes sont très présents lors de la réaction inflammatoire chronique et sont attirés et activés par les cytokines produites lors de la réaction inflammatoire aiguë et par les molécules d'adhésion [285]. Les lymphocytes ainsi activés produisent des médiateurs de réactions inflammatoires tel que l'IFN γ qui active les macrophages. Les lymphocytes recrutés dans un tissu peuvent directement attaquer les cellules cibles ou les microorganismes. Généralement, la présence de lymphocytes dans un tissu lors de la réaction inflammatoire chronique provoque le développement d'autoimmunité. Ce sont les cellules effectrices spécifiques

responsable de la cytotoxicité (T CD8+) ou des réactions d'hypersensibilité retardée (T CD4+) [173, 263].

Macrophages

Les macrophages représentent la forme mature des monocytes, qui sont des cellules circulantes présentes dans le sang à raison de 5 à 10% des leucocytes sanguins totaux [286]. Le développement des monocytes et des macrophages se déroulent dans la moëlle osseuse et comprend les étapes suivantes; le monoblaste, le promonocyte, le monocyte dans la moëlle osseuse, le monocyte en circulation et le macrophage dans les tissus. Durant la différenciation, des granules intracellulaires sont formés et contiennent diverses enzymes permettant de détruire les particules ingérées dont, des protéases neutres (collagénase et élastase), des hydrolases acides (sérine protéase, lipase, polysaccharidase) ainsi que des défensines [287]. Les macrophages sont présents dans de nombreux tissus où ils porteront différentes appellations. On retrouve par exemple, les cellules de Kupffer dans le foie, les macrophages alvéolaires dans les poumons, les ostéoclastes dans les os et se nommeront tout simplement macrophages, ces mêmes cellules qui sont présentes dans la rate et dans les tissus lymphoïdes [287]

Les macrophages jouent un rôle essentiel dans le développement de la réaction inflammatoire chronique. Généralement, les macrophages infiltrent le tissu plusieurs heures après l'arrivée des lymphocytes. De nombreux médiateurs produits soit par les lymphocytes ou par d'autres cellules immunes et non-immunes, sont nécessaires à l'attraction des macrophages au site inflammatoire. Parmi ceux-ci, l'IFN γ produit par les lymphocytes est le plus important médiateur impliqué dans l'attraction des macrophages au site inflammatoire mais également, dans leur activation [282]. Les macrophages sont aussi attirés par la molécule de complément C5a ainsi que par IL-8. Pour sa part, la chimiokine MIF (migration inhibitory factor) est plutôt impliquée au site inflammatoire afin de retenir les macrophages dans le tissu.

La fonction principale des macrophages est la phagocytose afin de permettre l'élimination des bactéries et débris tissulaires. Comme il a été mentionné précédemment, la phagocytose par les macrophages est stimulée par la présence d'anticorps ou de molécules du complément. L'activation des macrophages par ces médiateurs ou par les différentes cytokines et chimiokines présentes au site inflammatoire permet d'augmenter leur capacité de phagocytose et d'augmenter l'expression de récepteurs à la surface afin de favoriser la reconnaissance d'antigène ou d'anticorps [288]. Leur activation permet aussi une modification dans le contenu des enzymes lysosomiales ayant comme conséquence, d'augmenter leur activité cytotoxique et finalement, de permettre la production de cytokines [289].

1.6.4.6 Le système de coagulation et de cicatrisation

L'activation du système de la coagulation survient lors de toute réaction inflammatoire significative et permet de générer des médiateurs inflammatoires indispensables. Le système de la coagulation répond à des stimuli inflammatoires et provoque la formation d'aggrégats de plaquettes et de protéines insolubles dérivant de protéines solubles, la fibrine. Les aggrégats de fibrine permettent l'arrêt du saignement suite aux dommages tissulaires. Le système fibrinolytique est par la suite activé et est responsable de la dissolution de la fibrine restaurant la circulation dans le tissu. Cette réaction permet aussi l'initiation de la réparation par les fibroblastes lesquels ne peuvent se développer adéquatement en présence de fibrine [290].

L'étape de la cicatrisation et de la résolution commence durant la dernière phase de la réaction inflammatoire. Les médiateurs chimiotactiques et les facteurs de croissance présents dans le tissu permettent la migration cellulaire et la prolifération des cellules nécessaires à la cicatrisation. Parmi ces cellules, notons un rôle important apporté par les plaquettes, les cellules endothéliales, les

fibroblastes et les macrophages [291]. Les plaquettes produisent le premier facteur de croissance nécessaire à l'étape de cicatrisation, le PDGF (platelet-derived growth factor). Tel que mentionné précédemment, les macrophages éliminent les débris tissulaires mais produisent également des cytokines et facteurs de croissance dont IL-1, IL-6, TNF α , TGF- β , PDGF et FGF (fibroblast growth factor) régulant la prolifération des fibroblastes.

Le FGF stimule la production de cellules endothéliales et de fibroblastes nécessaire pour l'initiation de la phase de prolifération cellulaire et la formation du tissu. Pour leur part, le PDGF et le TGF- β stimulent la différenciation du tissu connectif et la formation de la matrice extracellulaire ainsi que l'expression des gènes de collagène et de fibronectine nécessaire à la cicatrisation. De plus, il possède un rôle régulateur important permettant de limiter la prolifération de certaines cellules inflammatoires. Malgré le rôle essentiel des macrophages dans l'élimination des pathogènes et débris tissulaires, le TGF- β permet de limiter les dommages tissulaires lors de la résolution de l'inflammation en inhibant la production de ROS. Les facteurs de croissance épidermiques sont chimiotactiques pour les cellules épithéliales et permettent de reconstituer l'épithélium suite aux dommages tissulaires [263, 291].

Les protéoglycans sont essentiels à l'étape de cicatrisation et à la résolution de la réaction inflammatoire. Ils sont constitués d'une protéine associée à une ou plusieurs chaînes glycosaminoglycanes. De nombreuses protéines peuvent lier les glycosaminoglycans qui par la suite, s'associent à des composants de la matrice extracellulaire, des cellules ou des facteurs de croissance [292]. Chacune des glycosaminoglycanes ont une charge négative leur permettant de lier plusieurs substances. Cette liaison entre le protéoglycan et les facteurs de croissance empêche la dégradation de ces facteurs. La restructuration de la matrice extracellulaire nécessite la synthèse par les fibroblastes de collagène et de fibres de tissu connectif. Ces molécules s'attachent ensuite à la surface cellulaire et aux molécules de protéoglycans afin de restructurer la matrice

extracellulaire. Les kératinocytes viennent également s'attacher à la matrice et aux protéoglycans pour permettre la formation de l'épithélium [292].

1.6.5 Le développement des maladies inflammatoires

Un système immunitaire dysfonctionnel mène au développement de maladies inflammatoires. Généralement, ces maladies impliquant le développement d'une réaction inflammatoire sévère et non régulée sont des maladies autoimmunes. L'autoimmunité est une défaillance du système immunitaire se défendant contre des composantes du soi qui sont reconnues comme étant du non-soi. Tout d'abord, des prédispositions génétiques semblent fortement impliquées dans le développement de maladies autoimmunes [293, 294]. De plus, des facteurs environnementaux tels les infections virales et bactériennes peuvent favoriser le développement de la maladie [294, 295].

Plusieurs cellules immunitaires sont impliquées dans le développement et l'amplification des maladies autoimmunes. Les lymphocytes jouent de nombreux rôles notamment via la production d'auto-anticorps par les cellules B dans diverses pathologies dont les mieux connues sont le lupus érythémateux systémique [296-299] et l'arthrite rhumatoïde [299-301]. Les lymphocytes T autoréactifs sont également très impliqués dans les maladies autoimmunes. En effet, les lymphocytes T CD8+ sont responsables via leurs activités cytotoxiques de la destruction des tissus et cellules environnantes dans la dermatite [302-304], du psoriasis [305, 306] ainsi que dans certaines pathologies inflammatoires de l'intestin [307-309]. De plus, des études ont démontré que les cellules T CD8+ étaient, en partie, responsables de la destruction des îlots pancréatiques associés au diabète de type 1 [310-313]. Par ailleurs, de nombreuses pathologies autoimmunes résultent d'une activité accrue des lymphocytes T CD4+ autoréactifs. Ces cellules ont aussi été reconnues comme jouant un rôle prédominant dans le développement du diabète de type 1 [314, 315], l'arthrite rhumatoïde [316] et le lupus érythémateux systémique [317].

Finalement, les monocytes/macrophages et les cellules polynucléaires sanguins ont d'importants rôles à jouer dans le développement mais surtout l'amplification des réactions autoimmunes. Le développement de nombreuses maladies autoimmunes nécessite la présentation d'auto-antigènes aux cellules T; cette présentation s'effectue via les CPA qui sont généralement des cellules dendritiques ou des macrophages [318-320]. La présentation antigénique provoque ensuite la production de cytokines inflammatoires qui contribuent à amplifier la maladie, notamment l'IFN γ et IL-12 [321, 322]. Effectivement, de nombreuses cytokines pro-inflammatoires ont été identifiées dans le sérum de patients atteints de maladies autoimmunes dont l'arthrite, le diabète et le lupus érythémateux systémique [322-325]. Cette production non seulement de cytokines mais aussi de chimiokines, permet le recrutement de cellules inflammatoires dans un tissu et amplifie ainsi la réaction inflammatoire associée aux maladies autoimmunes [322, 326]. De plus, une expression de molécules d'adhésion anormale a aussi été associée à un recrutement des cellules inflammatoires non contrôlé dans les maladies autoimmunes [327]. Il est également connu que ces cellules produisent des dérivés de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNOS) et que ces produits oxydants sont associés à diverses pathologies autoimmunes [328-331]. Les lésions et dommages tissulaires survenant dans une maladie auto-immune sont causés, entre autres, par le relâchement de ROS et de RNOS dans le tissu environnant [331-333].

1.6.6 Les principaux modèles animaux d'inflammation

La démonstration des effets immunomodulateurs et en particulier, des effets anti-inflammatoires par la consommation d'aliments fonctionnels et de probiotiques a été rapportée dans différents modèles animaux. Cette section décrit les principaux modèles animaux utilisés afin de démontrer ces bienfaits.

1.6.6.1 Modèle de la dermatite de contact

Depuis la découverte d'un transfert passif chez la souris lors d'une réaction d'hypersensibilité de contact en 1959 [334], de nombreuses études sur l'hypersensibilité ont été effectuées. Le modèle de la dermatite de contact a été développé et utilisé pour la première fois par Asherson et Ptak en 1968 [335]. Ces auteurs ont rapporté que les rongeurs peuvent facilement subir une immunisation par application d'agents chimiques sur l'abdomen, agissant dans ce modèle comme haptène. Ensuite, une réaction inflammatoire se produit au site de contact suite à une ré-exposition à l'agent chimique [335]. Les agents chimiques les plus communément utilisés sont le 2-phenyl-4-étoxyéthylène oxazolone [336], le chlorure de picryl [335], 1-chloro-2,4-dinitrochlorobenzène (DNCB) [337], 2,4-dinitro-1-fluorobenzène (DNFB) [335] et le tétraméthyl *p*-phénylediamine [335].

La dermatite de contact est une pathologie différente de celle de la dermatite atopique malgré des symptômes et des réactions immunitaires similaires. La dermatite atopique est une pathologie de type allergique se développant principalement chez les enfants. Elle est caractérisée par une concentration sérique élevée d'IgE [338, 339]. Les facteurs génétiques, l'âge et l'environnement sont très importants pour le développement de la dermatite atopique [338]. Pour sa part, la dermatite de contact est indépendante des facteurs génétiques et environnementaux et est caractérisée par une réaction au site de contact avec l'haptène impliqué dans la maladie. Les dermatites de contact les plus souvent rencontrées sont les réactions au nickel et au latex.

Le modèle murin de la dermatite de contact possède l'avantage principal de pouvoir être facilement quantifiable permettant ainsi, de démontrer le potentiel anti-inflammatoire d'un agent thérapeutique. En effet, la réaction inflammatoire se développe au niveau de l'oreille, celle-ci étant le site de ré-exposition à l'agent irritant. La mesure de l'épaisseur de l'oreille de l'animal permet donc d'évaluer

le degré d'inflammation [340]. L'application de l'agent irritant permet le développement d'une réaction inflammatoire de plus de sept jours avec une inflammation maximale après 24 à 48 heures [341].

Les principales étapes

Phase afférente : la sensibilisation

Lors du contact de la peau avec l'agent irritant, les kératinocytes sécrètent les cytokines inflammatoires TNF α et GM-CSF ce qui mène à l'activation des cellules de Langerhans. Les cellules de Langerhans ainsi activées sécrètent des cytokines inflammatoires, IL-12, IL-6, IL-1 β et IFN γ [342, 343]. De plus, il y a augmentation de l'expression à la surface de leur molécule du CMH. Les cellules de Langerhans, étant un membre important de la famille des cellules dendritiques, sont les principales CPA de la peau et par le fait même, sont très importantes dans le développement de réactions immunitaires cutanées.

Les cellules de Langerhans peuvent ainsi lier l'haptène directement sur leur molécule du CMH à leur surface ou l'internaliser dans un complexe antigénique. Par la suite, les cellules de Langerhans migrent via les vaisseaux lymphatiques afférents aux ganglions lymphatiques régionaux où il y a présentation aux cellules T naïves [344, 345]. Dans les ganglions, les cellules de Langerhans interagissent avec les cellules T via l'expression d'un grand nombre de complexes moléculaires CMH-antigène. Durant la présentation, les cellules de Langerhans sécrètent de grandes quantités de IL-12. Par la suite, IL-12 favorise le développement des cellules vers la voie Th1 et Tc1. L'activation via les complexes CMH-antigène mène à la production de cellules T activées qui circulent dans les tissus périphériques. Les cellules effectrices CD4+ et CD8+ sont impliquées dans la réaction d'hypersensibilité [302, 346]. Cependant, il est clairement démontré que les cellules T CD8+ ont un rôle majeur dans le développement et l'amplification de la maladie [346, 347].

Phase efférente : l'élicitation (ou challenge)

Lors d'une ré-exposition à l'agent irritant, les cellules de Langerhans captent l'antigène et le présentent aux cellules T activées dans les tissus périphériques. Les cellules T effectrices migrent ensuite dans le derme au site de contact et ainsi, activent les cellules de Langerhans et les kératinocytes à sécréter les cytokines IL-1 β , IL-6, TNF α , GM-CSF et les chimiokines MIP-1 α et MIP-2. Cette production de cytokines et chimiokines permet le recrutement de cellules CD8+ effectrices, monocytes/macrophages et de neutrophiles dans le derme.

L'infiltration des cellules T CD8+ est reliée avec l'apoptose des kératinocytes suggérant que les cellules épidermales sont les cibles des lymphocytes T cytotoxiques effecteurs [348]. L'apoptose des kératinocytes survient due à une augmentation de molécules telles que perforine, granzyme B et Fas ligand suggérant l'implication des deux mécanismes de l'apoptose dans la dermatite de contact [349-351].

La régulation

Il a été mentionné précédemment que les cellules CD4+ sont aussi impliquées et recrutées lors du développement de la maladie. Pour leur part, ces cellules sont plutôt impliquées dans la régulation et la résolution de la maladie [346]. Les cellules T régulatrices, via la production de IL-10 ont aussi démontré un mécanisme de régulation de la maladie relié à l'inhibition de la production de IL-12 et de la capacité des cellules dendritiques à activer les lymphocytes [352, 353]. Finalement, les cellules Th2 via la production de IL-4 possèdent aussi un rôle dans la régulation de la dermatite de contact [354].

1.6.6.2 Modèle de la poche d'air « Air Pouch »

Le modèle de la poche d'air a été développé par Selye dans les années 1950 dans le but d'évaluer quantitativement divers facteurs régulant les réactions

inflammatoires [355]. L'injection d'air stérile sous-cutanée dans le dos de rongeurs, mène au développement en 6 jours d'une structure cellulaire contenant majoritairement des fibroblastes (50-90%) et des macrophages (10-50%) [356]. Cette structure est similaire à la membrane synoviale autant morphologiquement que dans ses activités cellulaires. Il a été démontré que les réactions immunitaires impliquées dans le modèle de la poche d'air sont similaires à celles impliquées dans l'arthrite rhumatoïde [357]. L'injection d'un irritant dans la poche d'air conduit au développement d'une réaction inflammatoire aiguë caractérisée majoritairement par l'infiltration de neutrophiles [358]. Par exemple, lors de l'injection de LPS, plus de 85% des cellules recrutées sont des neutrophiles [358, 359]. Il est connu que la période d'incubation permettant un recrutement cellulaire maximal suite à l'injection de l'irritant est de six heures [360]. Effectivement, la concentration de neutrophiles dans la poche d'air après une période d'incubation de six heures est entre 15 et 20 millions ce qui est nettement supérieure à la quantité de neutrophiles présents initialement en circulation. Cette période de temps est suffisamment longue pour permettre une différenciation des neutrophiles à partir de la moëlle osseuse qui vont en circulation pour ensuite, migrer dans la poche d'air [360].

Le développement d'une réaction inflammatoire dans le modèle de la poche d'air est dépendant de l'action des macrophages et du $\text{TNF}\alpha$. Des études antérieures à l'aide de ce modèle chez des rongeurs déficients en macrophages ou en $\text{TNF}\alpha$ ont démontré l'inhibition de l'extravasation des leucocytes suite à l'injection de LPS [361]. L'injection de LPS dans la poche d'air déclenche la production de $\text{TNF}\alpha$ par les macrophages et cette cytokine est responsable du recrutement des neutrophiles [362]. La production de $\text{TNF}\alpha$ mène à une réaction autocrine afin de favoriser la production d'autres cytokines et chimiokines par les macrophages qui auront des activités chimioattractives pour les neutrophiles [363, 364]. L'analyse de l'exudat cellulaire permet d'évaluer l'effet d'un produit ou drogue sur le développement d'une réaction inflammatoire soit par la

concentration de cellules recrutées ou par le profil de cytokines et chimiokines, indiquant le degré d'activation des cellules immunitaires.

1.6.6.3 Modèle de la polyarthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune caractérisée par le développement d'auto-anticorps contre des antigènes du soi [365, 366]. Les cellules B, outre la production d'auto-anticorps, jouent un rôle prédominant dans le développement de l'arthrite rhumatoïde. Effectivement, elles remplissent un rôle de CPA en présentant les antigènes aux cellules T et ainsi, activent ces cellules, particulièrement les cellules T CD4+ [367-369]. La production de cytokines et chimiokines provoque ensuite le développement de l'inflammation en attirant les cellules inflammatoires, en majorité les neutrophiles [370-374]. De nombreuses études ont identifié le rôle de la nutrition dans le développement et l'amplification de l'arthrite rhumatoïde [375]. Conséquemment, il a été rapporté que la consommation de plusieurs produits nutraceutiques améliore les symptômes et diminue les réactions inflammatoires [376-380].

Le modèle d'arthrite induit par le collagène est le modèle se rapprochant le plus de l'arthrite rhumatoïde se développant chez l'humain [381, 382]. Ce modèle est aussi caractérisé par le développement d'auto-anticorps et fait intervenir les cellules B et les cellules T pour permettre le recrutement de cellules inflammatoires tout comme chez l'humain [383, 384]. L'injection de collagène issu de cartilage provoque le développement d'une auto-immunité contre le collagène menant à la destruction des articulations et conséquemment, à l'inflammation. La première phase de la maladie apparaît suite au dépôt d'anticorps sur la surface du cartilage. L'inflammation se développe rapidement avec la destruction du cartilage articulaire par les cellules inflammatoires en seulement quelques jours. De nombreuses études démontrent l'implication essentielle des neutrophiles dans le développement et le maintien de l'arthrite

rhumatoïde. Il est connu que les neutrophiles contribuent à l'inflammation en libérant le contenu enzymatique de leurs granules par exemple, la myéloperoxidase, l'élastase, la collagénase, ce qui cause des dommages irréparables aux tissus. Les neutrophiles produisent aussi des cytokines et des chimiokines inflammatoires qui contribuent au recrutement et à l'activité des cellules immunitaires [385-388].

1.6.6.4 Modèle d'inflammation intestinale

Les produits nutraceutiques et en particulier, les probiotiques sont souvent étudiés quant à leurs effets sur les maladies inflammatoires de l'intestin. De nombreux modèles animaux de colite ulcéreuse ou d'inflammation intestinale ont été développés. Ces modèles peuvent être classés en cinq catégories soit : *i*) l'inactivation de gènes (Gene Knockout); *ii*) les modèles transgéniques de colites; *iii*) les modèles spontanées de colites; *iv*) les modèles inductibles de colites et *v*) les modèles de colites par transfert adoptif [389]. Parmi ceux-ci, les modèles d'inflammation intestinale induit chimiquement par le « dextran sulfate sodium » (DSS) [73, 390-393] et le « trinitrobenzene sulfonic acid » (TNBS) [75, 76, 394-397] sont ceux les plus souvent utilisés pour évaluer le potentiel anti-inflammatoire des probiotiques.

L'administration, directement dans le rectum des souris, de TNBS dissous dans l'éthanol provoque la destruction de la barrière mucoale menant au développement d'une colite [398]. Ce modèle est caractérisé par l'infiltration de cellules inflammatoires, principalement des macrophages produisant de IL-12 et des lymphocytes sécréteurs d'IFN- γ et IL-2, et suggère que cette maladie est médiée par une réponse de type Th1 [399].

Le modèle d'inflammation induit par le DSS nécessite l'administration du DSS dissous dans l'eau que consomme les animaux. Ce type de maladie mène au développement d'anémie, de perte de poids, d'ulcères mucoaux et d'infiltration

neutrophiliques. Tout comme l'inflammation induite par le TNBS, celle-ci est causée par l'activation des lymphocytes, principalement des lymphocytes CD4+, via la sécrétion de cytokines inflammatoires par les macrophages [400, 401]. La production de dérivés de l'oxygène et de dérivés de l'azote (RONS) est impliquée dans le développement et l'amplification de la maladie [402]. Il est connu que les animaux ayant été soumis au DSS auront un côlon beaucoup plus court et plus épais, signe évident et quantifiable du degré d'inflammation permettant facilement l'évaluation du potentiel anti-inflammatoire entre autres, de produits probiotiques [400].

1.6.7 Les mécanismes de régulation des maladies inflammatoires

De nombreux mécanismes ont été découverts quant à leur potentiel à inhiber, ou du moins à réguler, les maladies inflammatoires. Certains aliments et produits nutraceutiques sont reconnus comme agissant selon un ou plusieurs de ces mécanismes de régulation.

1.6.7.1 Cellules T régulatrices

Les cellules T régulatrices ont pour la première fois été découvertes lors de l'étude des mécanismes de la tolérance orale. Les cellules T régulatrices impliquées dans les mécanismes de tolérance orale se développent dans le GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue) suite à la rencontre de faibles doses de l'antigène [403]. La suppression des réponses immunes par ces cellules, communément appelées Th3, se fait principalement via la production des cytokines suppressives IL-10 et TGF β [404, 405]. Ces cellules sont généralement des lymphocytes CD4+CD25+ produisant du TGF β .

Par la suite, la découverte d'une sous-population de cellules du sang responsable de la prévention de pathologies immunitaires a démontré que les cellules T régulatrices possèdent des rôles plus importants et plus diversifiés que

ceux impliqués dans la tolérance orale. Une sous-population de cellules sanguines est caractérisée comme étant des cellules T CD4+CD25+ et représente 5-10% des lymphocytes T du sang [406]. L'expression du facteur de transcription Foxp3 est essentielle dans la différenciation des cellules CD4+ en cellules T régulatrices CD4+CD25+ [407]. Les souris déficientes en Foxp3 développent des maladies autoimmunes tout comme les souris déficientes en cellules T régulatrices CD4+CD25+ [407]. Le développement de ces cellules T régulatrices CD4+CD25+Foxp3+ s'effectue dans le thymus et est dépendant de la présentation antigénique par les cellules épithéliales du thymus [408]. De nombreuses évidences suggèrent que le développement de cellules T régulatrices s'effectuent également en périphérie. Dans la circulation sanguine, les cellules T CD4+ matures se développent en cellules T régulatrices suite à l'expression de Foxp3 [409, 410]. Elles possèdent la caractéristique principale de demeurer pour une très longue période de temps en périphérie. Les CPA résidentes mènent aussi au développement des cellules T régulatrices CD4+CD25+ par l'induction de l'expression de Foxp3 chez les cellules T CD4+. Lors d'une infection, les CPA s'activent et produisent de IL-6 suite à la reconnaissance d'un PAMP via les TLR. Cette activation des CPA et la production de IL-6 inhibe l'activité des cellules T régulatrices. Par conséquent, un système immunitaire sain aura un parfait équilibre entre l'activité des cellules T effectrices et des cellules T régulatrices [411].

Les cellules T régulatrices agiraient via deux mécanismes d'action différents dépendamment du contexte et du type de cellules T régulatrices. Premièrement, certaines de ces cellules peuvent inhiber une réaction immunitaire via la production des cytokines suppressives TGF β et IL-10. Par la suite, ces cytokines ont pour rôle d'empêcher la production de d'autres cytokines impliquées dans le développement de maladies immunitaires [412-417]. Il a aussi été rapporté que malgré le rôle suppresseur du TGF β , celui-ci est impliqué dans le développement des cellules T régulatrices via l'induction de l'expression de Foxp3 par les cellules CD4+ [418, 419]. Le deuxième mécanisme de régulation

par ces cellules est l'interaction cellule-cellule. Le récepteur CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4) est fortement exprimé par les cellules T régulatrices et son inhibition élimine l'activité fonctionnelle des cellules T régulatrices suggérant son importance dans le mécanisme d'action de ces cellules [412, 420-422]. L'interaction du CTLA-4 avec les protéines de costimulation transmembranaires B7 sur les CPA supprime le signal d'activation des cellules T par les CPA [423, 424].

Une sous-population de cellules T CD8+ a été identifiée comme possédant également des rôles suppresseurs. Ces cellules possèdent des propriétés de régulation de certaines maladies immunitaires [425, 426]. Ces cellules T CD8+ régulatrices agissent principalement via la production de cytokines TGF β et IL-10 [427, 428] ou par l'inactivation des cellules dendritiques [429].

Finalement, il est connu que certaines cellules effectrices peuvent aussi jouer un rôle régulateur important dans des pathologies précises. Par exemple, dans le modèle de la dermatite de contact médiée par les cellules T cytotoxiques CD8+, les cellules T CD4+ sont responsables de la régulation de la maladie via la production de cytokines anti-inflammatoires supprimant la production de cytokines pro-inflammatoires [430].

1.6.7.2 Modulation de l'expression des molécules d'adhésion et de la production des cytokines et chimiokines

Les molécules d'adhésion sont, comme mentionné précédemment, très importantes dans le processus d'extravasation des leucocytes dans un site inflammatoire. Par conséquent, la modulation de l'expression de ces molécules d'adhésion permet un contrôle important de l'infiltration cellulaire et ainsi, des réactions inflammatoires. Des molécules d'adhésion ont été retrouvées en grand nombre dans le sérum de patients souffrant de maladies inflammatoires [431]. Il

a été démontré que la consommation de produits nutraceutiques par exemple, les acides gras essentiels (omégas-3 et omégas-6) nécessaires à la formation des cellules et apportant l'énergie pour remplir pleinement leurs fonctions, les statines (ou inhibiteurs de la HMG-CoA réductase) et certains antioxydants, réduisent la présence de molécules d'adhésion et conséquemment, l'extravasation des leucocytes [432-435].

Il est bien connu que le facteur de transcription NF- κ B est indispensable pour l'expression de cytokines inflammatoires, de chimiokines et la régulation du système immunitaire [436, 437]. Il a également été démontré qu'il y a des sites de liaison pour NF- κ B dans les régions régulatrices des gènes pour les molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine [438, 439]. Par conséquent, les inhibiteurs de NF- κ B inhibent non seulement la production de cytokines inflammatoires, de chimiokines mais également l'expression des molécules d'adhésion [439]. La consommation de probiotiques en situation inflammatoire permet d'inhiber la voie d'activation médiée par NF- κ B permettant ainsi une inhibition de la production de cytokines inflammatoires [440, 441]. Certains composés antioxydants ont également démontré une inhibition de la voie d'activation NF- κ B [442-445]. L'inhibition de la voie NF- κ B est un mécanisme de régulation des maladies inflammatoires très efficace dû à l'inhibition autant des chimiokines, des cytokines inflammatoires et des molécules d'adhésion.

La modulation de la production de cytokines permet la régulation de différentes maladies inflammatoires (Th1) ou à prédominance atopique (Th2). Il est rapporté que lors d'une maladie impliquant le système immunitaire, une modification dans la balance de production de cytokines Th1/Th2 est impliquée [446]. Conséquemment, la modulation de la production de cytokines permet un retour de la balance Th1/Th2 vers l'équilibre idéal et régule ainsi les maladies immunitaires [446]. Par exemple, la stimulation de la production de cytokines de la voie Th1 permet une réduction importante des allergies et de la production d'IgE [52, 65, 447]. Parallèlement, la stimulation des cytokines de la voie Th2

permet une régulation des maladies inflammatoires et rétablie l'équilibre de la balance Th1/Th2 en faveur d'une voie anti-inflammatoire [448-451]. Finalement, comme mentionné précédemment, la production des cytokines IL-10 et TGF β permet une régulation importante des maladies inflammatoires [412-417].

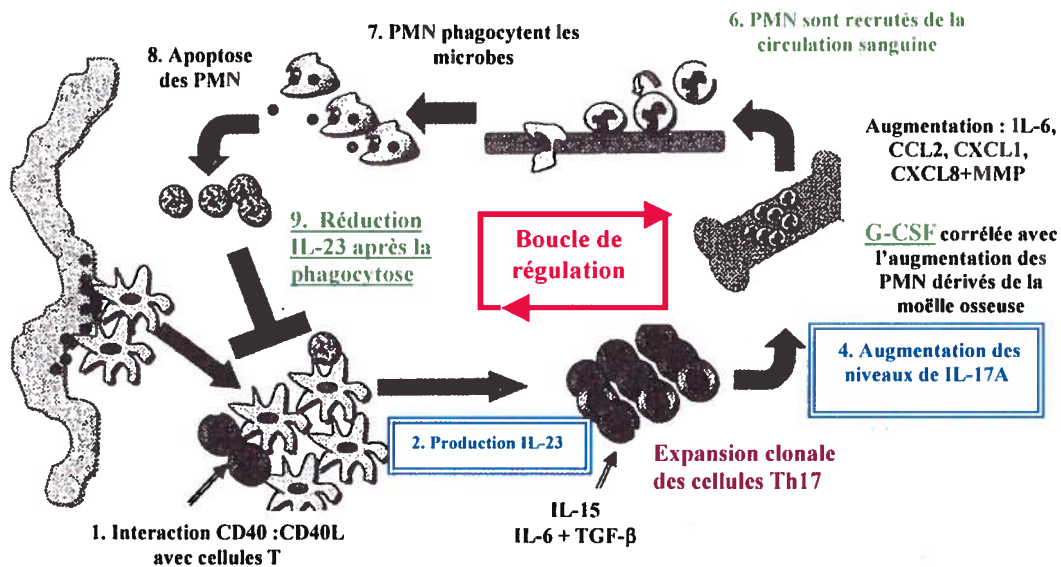
1.6.7.3 Régulation par les cellules Th17

Dans des conditions homéostatiques normales, les neutrophiles sont générés par la moëlle osseuse et ne survivent que quelques heures dans la circulation sanguine. Ils mourront ensuite par apoptose si aucun stimulus ne les active et les recrute. Par contre, le taux de génération des neutrophiles augmente considérablement dans des conditions de défenses infectieuses ou inflammatoires. Depuis plusieurs années, certaines équipes avancent l'hypothèse qu'un mécanisme de régulation unique et particulier contrôlerait la production et l'activité des neutrophiles [452]. Des études ont tout d'abord démontré qu'une population lymphocytaire, qui semblait différente des cellules Th1 et Th2, produisait de IL-17 suite à l'activation par IL-23 [453-457]. Les cellules Th17, ont très récemment été découvertes, et possèdent un mécanisme de régulation du système immunitaire directement associé aux neutrophiles. Ces cellules aussi appelées, lymphocytes régulateurs de neutrophiles, sont activées par la production de IL-23 et sécrètent ensuite la cytokine IL-17A. IL-23 est une cytokine hétérodimérique partageant la sous-unité p40 avec IL-12 et une sous-unité unique p19. IL-23 est produite par les macrophages et les cellules dendritiques en réponse à un stimulus. IL-17A favorise à son tour la granulopoïèse via la production de G-CSF et GM-CSF [458, 459].

Lors d'une défense infectieuse, les neutrophiles ainsi produits et activés engendrent une réponse dépendante des granulocytes [457]. Lorsque l'agent infectieux a été éliminé, ces granulocytes deviennent apoptotiques et sont phagocytés par les macrophages. Cette étape de phagocytose est essentielle dans la régulation des cellules Th17 puisqu'elle donnera le signal pour arrêter la

production de IL-23 et par le fait même, la granulopoïèse [460]. Le mécanisme de régulation des cellules Th17 est démontré à la figure 2. En contre partie, en situation inflammatoire, non seulement il y a une concentration supérieure de neutrophiles, mais la production de IL-17 favorise la production des cytokines inflammatoires IL-1, IL-6, IL-8 et TNF α [461, 462].

La cytokine IL-23 et les cellules Th17 sont impliquées dans de nombreuses pathologies immunitaires et inflammatoires telle que le diabète [463, 464], la dermatite de contact [465], le psoriasis [466-468], l'arthrite [469-472] et les maladies inflammatoires de l'intestin [473-475]. La régulation de ces cellules ou de la production de la cytokine IL-23 pourrait être un nouveau mécanisme, très peu connu, de protection ou de traitement de ces pathologies immunitaires malgré l'absence à ce jour de traitement connu agissant sur cette voie.



(Adapté de Ley et al., 2006)

FIGURE 2. BOUCLE DE RÉGULATION DES CELLULES TH17.

Les cellules dendritiques et les macrophages reconnaissent l'agent microbien et ainsi, augmentent l'interaction via CD40:CD40L avec les cellules T (1). Cette reconnaissance de l'agent microbien favorise la production de IL-23 (2). IL-23 ainsi que d'autres médiateurs (IL-15, IL-6+TGFβ) mènent ensuite à l'expansion clonale et à la survie des cellules Th17 (3) qui produisent ainsi, IL-17A (4). Cette production de IL-17A mène à la production de G-CSF (et GM-CSF) qui favorise la différenciation des PMN à partir de la moëlle osseuse (5). Les PMN ainsi produit migrent en circulation et ensuite, sont attirés au site d'infection (6). Ils phagocytent les microbes pour défendre l'organisme selon un mécanisme de réponse dépendante des granulocytes (7). Suite à la destruction microbienne, les PMN deviennent apoptotiques et sont phagocytés par les macrophages résidents (8). Cette phagocytose permet la réduction de la production de IL-23 qui ainsi, permet l'inhibition de la production des cellules Th17 (9).

1.6.7.4 Interaction des motifs CpG avec le TLR9

Dans les maladies inflammatoires de l'intestin, il a été démontré que la consommation de certaines espèces de probiotiques exhibent un effet anti-inflammatoire. Il est connu que les probiotiques stimulent l'immunité innée via l'interaction de leurs motifs CpG et/ou oligonucléotides avec le TLR9 menant ainsi à l'activation de la voie de signalisation NF- κ B et par conséquent, à la production de cytokines de la voie Th1 [94-96]. Cependant, malgré la stimulation du système immunitaire par les probiotiques, il est également suggéré que ceux-ci possèdent un effet anti-inflammatoire dans des modèles de colite ulcéreuse. Le mécanisme d'action serait également, dans certains cas, relié à cette interaction avec le TLR9 [97-99]. Cet effet anti-inflammatoire via le TLR9 est dû à une sous-population de cellules dendritiques, les CD8 α + dans le GALT, qui possède la capacité de sécréter IFN α lors d'une interaction entre les TLR9 présents à leur surface et les motifs CpG [476, 477]. La production IFN α favorise le développement des cellules T CD4+ en cellules T régulatrices CD4+CD25+ [477-479]. Ces cellules T régulatrices produisent ensuite, les cytokines suppressives et anti-inflammatoires, IL-10 et IL-4, expliquant ainsi l'effet anti-inflammatoire observé au niveau intestinal par la consommation de probiotiques [477, 480, 481].

CHAPITRE 2 : HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

HYPOTHÈSE

La valorisation du lactosérum par une souche de bactérie lactique génère un produit à forte valeur ajoutée, la Matrice Protéique Malléable (MPM); et ce, dans l'optique de créer un aliment fonctionnel possédant de nombreux bienfaits sur la santé. Ces aliments fonctionnels peuvent désormais posséder l'appellation de « alicament », c'est-à-dire un aliment possédant des caractéristiques qui était à ce jour attribuées qu'aux médicaments. La littérature démontre bien que la MPM possède de nombreux constituants pouvant lui conférer ce pouvoir de devenir un excellent produit naturel pour la modulation du système immunitaire. Effectivement, il a été rapporté précédemment que chacune des composantes de la MPM, étudiée séparément, agit en stimulant l'immunité ou en régulant les maladies inflammatoires et allergiques.

Conséquemment, ces connaissances permettent de formuler l'hypothèse du projet de recherche qui envisage que les composantes de la MPM pourraient agir en synergie ou par antagonisme avec certains autres constituants permettant ainsi à la MPM d'exhiber soit des activités immunostimulantes ou anti-inflammatoires.

OBJECTIFS

Par conséquent, les objectifs de recherche suivants ont été déterminés :

- 1- Évaluer le potentiel immunomodulateur de la MPM dans des modèles animaux immunocompétents (sains).
- 2- Évaluer le potentiel antioxydant de la MPM, un indicateur de la modulation de l'immunité.
- 3- Évaluer la production des différentes populations lymphocytaires dans la rate et les plaques de Peyer chez des animaux sains.
- 4- Évaluer l'effet anti-inflammatoire de la MPM dans un modèle animal de dermatite de contact.
- 5- Comparer l'effet anti-inflammatoire de la MPM avec celui obtenu avec l'hydrocortisone, un glucocorticoïde souvent utilisé pour traiter les maladies inflammatoires, ainsi que les effets secondaires généralement associés avec cette médication.
- 6- Évaluer la modulation de la production de lymphocytes effecteurs et/ou régulateurs dans la dermatite de contact.
- 7- Évaluer les effets de la MPM sur le recrutement et l'activité des neutrophiles dans le modèle murin de la poche d'air.
- 8- Évaluer les effets de la MPM sur les activités macrophagiques.
- 9- Évaluer la modulation de la production de cytokines dans divers modèles animaux dans l'objectif de déterminer le mécanisme d'action de la MPM

Chapitre 3 : Article I

3.1 Mise en contexte

La recherche de la littérature portant sur les effets immunomodulateurs des protéines et peptides de lactosérum a permis de constater que peu de recherches portent sur ce sujet et que cette science est relativement jeune. De nombreuses études ont rapporté les effets de protéines laitières sur la santé et sur le système immunitaire mais seulement un nombre restreint de chercheurs se sont intéressés aux effets santé des protéines se retrouvant spécifiquement dans la fraction lactosérum du lait. Le lactosérum étant riche en protéines et étant intégré dans de nombreux ingrédients alimentaires; il se doit d'être mieux connu pour être mieux valorisé. Quelques études ont rapporté les bienfaits des protéines de lactosérum et en particulier, l'activité de la lactoferrine, étant la plus étudiée et connue des protéines de lactosérum. À ce jour, un nombre intéressant de peptides bioactifs ont été identifiés comme provenant de la caséine laitière, la principale protéine laitière exclue de la fraction lactosérum. Cependant, l'identification de peptides spécifiques à la fraction lactosérum est limitée. Néanmoins, ces quelques peptides de lactosérum connus possèdent aussi des bienfaits sur le système immunitaire. Une synthèse des peptides de lactosérum identifiés va permettre la recherche approfondie dans ce domaine et l'identification rapide de nouveaux peptides bioactifs.

Contrairement aux études sur les protéines et peptides laitiers, celles sur le lactosérum quoique très concluantes n'ont jamais fait l'objet d'une revue exhaustive. Cet article est une synthèse complète des bienfaits reconnus des protéines et peptides de lactosérum sur le système immunitaire.

Les objectifs spécifiques de cet article étaient :

- i) Compiler les connaissances sur les effets immunomodulateurs des protéines et peptides de lactosérum.

- ii) Offrir un outil scientifique complet aux chercheurs oeuvrant dans la domaine de la recherche des bienfaits des protéines et peptides de lactosérum.
- iii) Offrir un outil scientifique complet permettant l'avancement des découvertes de nouveaux peptides bioactifs du lactosérum.
- iv) Permettre de faire connaître les protéines et peptides de lactosérum ainsi que leur potentiel pour la santé aux professionnels et au public.

3.2 Contribution des auteurs

J'ai entièrement effectué la recherche bibliographique ainsi que la rédaction de cet article. Le Dr Dupont et le Dr Lemieux m'ont supervisé dans la rédaction et la correction de l'article ainsi que dans la vérification qu'aucunes études pertinentes au moment de la rédaction de cette revue n'ont été omises.

3.3 Résumé français

Whey proteins and peptides: Beneficial effects on immune health.

Josée Beaulieu^{1,2}, Claude Dupont¹ and Pierre Lemieux^{2*}.

1. Institut national de la recherche scientifique- Institut Armand-Frappier, 531 blvd. des Prairies, Laval, Quebec, Canada, H7V 1B7.
2. Technologie Biolactis, 531 blvd. des Prairies building 18, Laval, Quebec, Canada, H7V 1B7.

Depuis la dernière décennie, les produits de santé naturelle connaissent un engouement immense de la part de la communauté scientifique et spécialement, des immunologistes. Plusieurs études récentes ont démontré des effets importants de ces produits sur diverses facettes du système immunitaire en passant de la stimulation de l'immunité innée et adaptative à un effet anti-inflammatoire. Plusieurs de ces effets bénéfiques sont associés aux protéines et peptides de lactosérum, lesquels sont bien connus depuis plusieurs années pour leurs bénéfices sur l'énergie et l'endurance sportive, pour leur effet protecteur sur divers cancers ainsi que pour leur effet de diminution des lipides sanguins. Récemment, cette classe de produits a attiré l'attention des immunologistes due aux évidences de leurs bienfaits sur le système immunitaire. Cette revue porte sur les études démontrant les effets immunomodulateurs associés à chacun des protéines et peptides découvert dans le lactosérum.

Article publié dans : *Therapy*, 2006 ; 3(1) : 69-78.

Reproduit avec la permission de Future Medicine Ltd.

3.4 Whey proteins and peptides: Beneficial effects on immune health.

Josée Beaulieu^{1,2}, Claude Dupont¹ and Pierre Lemieux^{2*}.

1. Institut national de la recherche scientifique- Institut Armand-Frappier, 531 blvd. Des Prairies, Laval, Quebec, Canada, H7V 1B7.

2. Technologie Biolactis, 531 blvd. des Prairies building 18, Laval, Quebec, Canada, H7V 1B7.

Correspondance* : Pierre Lemieux

Technologie Biolactis

531 blvd. Des Prairies, building 18

Laval (QC), Canada

H7V 1B7

Tél. (450) 686-5811

Fax. (450) 686-5501

e-mail: plemieux@biolactis.com

Abstract

Since the last decade, natural health products have been subject to an immense infatuation by the scientific community and especially, immunologists. Numerous recent studies have demonstrated important effects on all facets of immunity starting from stimulation of innate and adaptive immunity to an anti-inflammatory effect of these products. In many of these enhancing health products, whey proteins and whey peptides are present, which, for many years, are well known for their benefits on energy and sport endurance, for their protection against cancers as well as for their serum lipid-lowering effect. Recently, this class of product has gained interests for immunologists in regard to the ever-increasing body of evidences for effects on the immune system. This review focuses on studies showing immune effects associated with each of the whey proteins and peptides discovered from whey.

Introduction

Until recently, whey proteins have been mostly studied for their positive effects on endurance by increasing muscle protein balance during sport training [1]. Moreover, many studies have also demonstrated that the whey proteins possess an excellent lowering effect on serum lipid levels and on blood pressure [2]. The discovery of antioxidant potential of whey protein products [3] is one of the principal studies demonstrating a potential health benefit of these products for cancer and the immune system. Subsequently, many studies reported a protective effect against different types of cancer by the whey proteins as shown in a review by Bounous [4].

Presently, most researchers focus on the effects of whey proteins as well as whey peptides on immune health and their protective roles on immune disorders. Whey is mainly composed of proteins as well as many peptides derived from these proteins. The proteins found in whey are principally β -lactoglobulin, α -

lactalbumin, lactoferrin, immunoglobulin and bovine serum albumin (BSA). Their biochemical properties as well as their concentrations in milk and whey are summarized in Table 1. All of these proteins and peptides possess specific effects on immunity. These effects will be discussed in this review in relation to specific associated proteins or peptides and is summarized in Table 2.

β -lactoglobulin

β -lactoglobulin is the most abundant protein found in whey comprises between 55-65% of the total whey protein content. This protein possesses numerous physico-chemical attributes such as acting as an emulsifier, as well as many reported health effects.

Bounous and Kongshavn were among the first researchers to demonstrate an immuno-enhancing effect of β -lactoglobulin, in 1985. They have shown that the whey proteins (principally β -lactoglobulin and BSA) increase the antibody-forming cells in the spleen of mice immunized with trinitrophenylated ficoll [5]. Subsequently, the team of Wong and collaborators have demonstrated that the stimulatory effects of β -lactoglobulin on normal murine spleen cells are more intense than those observed with BSA [6]. These immune effects on murine spleen cells postulated to be due to an increase of the glutathione (GSH) production by splenocytes has been confirmed by addition of s-(n-butyl)-homocysteine sulfoxamine, an inhibitor of glutamylcysteine synthetase, which in this case, has blocked the stimulatory effect [6].

Controversially, another study demonstrated that the observed effects of β -lactoglobulin on spleen cells to produce Th1 cytokines are due to endotoxin contamination [7]. This study conducted with a commercial β -lactoglobulin product and utilization of their specific isolation technique leads to the presence of endotoxin in preparation of β -lactoglobulin. However, the team of Wong and

collaborators has proven that the effect observed with β -lactoglobulin is not due to endotoxin contamination by the utilization of polymixin B, a LPS inhibitor [6]. The utilization of this LPS inhibitor markedly reduced the effect of LPS but had no effect on β -lactoglobulin. This study confirms that the β -lactoglobulin really possesses an immunomodulatory effect. It is important to note that the preparation is essential in the quality and reliability of results as demonstrated by Brix *et al.* [7]. An additional control should be included in the study to confirm the validity of results.

Peptides from β -lactoglobulin

Many studies have been conducted with specific peptides from β -lactoglobulin, but due to complex nature of that protein, some of the peptides derived from it are likely still unknown. Four peptides from β -lactoglobulin exhibit anti-microbial activities [8]. β -lactoglobulin is also a carrier of many small hydrophobic molecules. One of them is retionic acid, which is a modulator of lymphocyte responses [9].

A peptide from β -lactoglobulin, called β -lactotensin, has demonstrated an effect on the contraction of the ileum longitudinal muscle [10]. Another study done with β -lactotensin showed similar results, that peptide possesses a stimulating effect on smooth muscle *in vitro* [11]. Smooth muscle is responsible for the contractility of hollow organs, such as blood vessels, the gastrointestinal tract, the bladder, or the uterus. Many diseases including allergy, asthma and atherosclerosis are related to dysfunctions of smooth muscle. Although the role of smooth muscle cells is contraction, they exhibit extensive phenotypic diversity during normal development, during repair of vascular injury, and in disease states [12]. The stimulating effect of β -lactotensin on smooth muscle provides the information that this peptide can enhance general health.

However, β -lactoglobulin is the principal protein responsible for milk allergies in children. Two to three percent of children suffer from milk allergies but in 80% of the case the allergy symptoms disappear before age three [13]. It has been demonstrated that the peptides from β -lactoglobulin induce oral tolerance and consequently, diminish the IgE production specific to β -lactoglobulin [14]. This observation suggests that the consumption of peptides from β -lactoglobulin possesses an important protective role against milk allergies.

α -lactalbumin

The α -lactalbumin is the second major protein present in whey accounting for 15 to 25% of the whey protein content. This protein is rich in essential amino acids and has a low immunogenicity indicating that α -lactalbumin is a good nutrient for children [15]. It is also been shown that a diet supplemented with α -lactalbumin increases the resistance against acute infection caused by *E. coli* [16].

In the 1980's, many studies have demonstrated an immuno-enhancing effect of α -lactalbumin in mice [17, 18]. Despite these studies, it is surprising to observe an absence of research on immunomodulatory effects of α -lactalbumin. It has been clear since 1997 that α -lactalbumin possesses stimulatory effects. The production of IL-1 β by sheep macrophages issued from bronchoalveolar lavage is increased by the presence of this protein [19].

The team of Svanborg and collaborators has identified a variant of α -lactalbumin similar to the modified α -lactalbumin found in the stomach of nursing children, which possess interesting immune effects [20, 21]. This protein can protect from cancer by induction of apoptosis in tumor cells as well as immature cells but has no effect on healthy cells [21].

Peptides from α -lactalbumin

Hydrolysed α -lactalbumin, which contains unidentified peptides, has demonstrated a modulation of B lymphocyte as well as T lymphocyte activities [5]. After this observation, researches in identification of peptides from α -lactalbumin as well as its associated immunomodulatory effects have been undertaken.

An immunomodulatory tripeptide derived from α -lactalbumin has been discovered [22]. This tripeptide, called GLF (glycyl-leucyl-phenylalanine), stimulates the adherence as well as phagocytosis of human monocytes and macrophages apparently by a mechanism of binding to specific receptors for GLF on these cells [22, 23]. The same research team evaluated the properties of this tripeptide, GLF on human and rat polymorphonuclear cells (PMNs). GLF increases the production of superoxide anion by human PMNs, which means that oxidative burst response is increased in the presence of GLF. The phosphoinositide metabolism is also increased by the presence of GLF, which can be seen by liberation of a second messenger, IP₃, leading to an enhancement in membrane fluidity [24]. Moreover, a study done with another peptide (Tyr-Gly-Gly) from α -lactalbumin revealed a stimulation of human peripheral blood lymphocytes in presence of this peptide [25]. In relation to anti-microbial activities, Pelligrini *et al.* have identified that these previously described three peptides from α -lactalbumin possess interesting anti-microbial activities [26].

Lactoferrin

Lactoferrin, an antioxidant glycoprotein having iron-binding properties, is the most studied of whey proteins and also seems to be the better immunomodulatory whey protein. The antioxidant capacity of lactoferrin is due to the iron-binding site that participates in the generation of hydroxyl radicals [27]. This iron-binding

capacity is also responsible in part for its anti-microbial potential [28]. Lactoferrin is found in colostrums [29], in mucosal secretions [30], as well as in neutrophil granules [31]. The localisation of lactoferrin in important sites implicated in acquiring immunity suggests an important contribution of lactoferrin in immune health. In whey, the proportion of lactoferrin is 1-2 %. Numerous studies on the roles of lactoferrin in immunity have been conducted, this paper will review the most significant observations reported.

Lactoferrin exhibits a real immunomodulatory potential by its capacity to both acts as an immunosuppressive as well as an immunostimulatory agent. Certain studies revealed the anti-inflammatory potential of lactoferrin in some circumstances while others the immune status demonstrated its stimulatory potential.

Lactoferrin possesses an anti-inflammatory potential in part by inhibition of cytokines such as $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$, which are key inflammatory cytokines [32]. Many animal models demonstrate that lactoferrin can protect against inflammatory conditions. A study by Dial and collaborators shows that the lactoferrin protects against gastritis induced by *Helicobacter felis* bacterium in mice [33]. Moreover, local administration of lactoferrin in inflamed joints of two different arthritis models in mice shows a strong local anti-inflammatory effect not related to the reduction of pro-inflammatory cytokine IL-6 [34]. The effect of this protein on arthritis has also been reported in another study in which lactoferrin protects against arthritis in rats induced by adjuvant administration in the right hind paw [35]. In this model, the protective effect against arthritis is due to a down-regulation of pro-inflammatory cytokine $\text{TNF}\alpha$ and an up-regulation of anti-inflammatory cytokine IL-10 [35].

Lactoferrin also possesses the capacity to inhibit the atopic contact dermatitis induced by oxazolone. In this study, lactoferrin applied topically prior to oxazolone-sensitisation prevents, in a dose-dependent manner, the migration of

Langerhans cells into the lymph nodes and subsequent activation of cytotoxic T cells and accumulation of dendritic cells in inflamed sites. The mechanism of action seems to be an inhibition of TNF α production by keratinocytes, which is the cytokine responsible for delivering the activation signal by keratinocytes to Langerhans cells [36]. Lactoferrin has the ability to bind the CpG motifs via charge-charge interactions of the N-terminal sequence of lactoferrin. This binding of CpG on lactoferrin inhibits the stimulatory effects of these motifs on immune cells [37]. The binding of CpG and LPS suggests another mechanism for the anti-inflammatory effect of lactoferrin.

The immunosuppressive potential of lactoferrin has also been observed in lymphocyte cells; this protein demonstrates an inhibitory effect on lymphocyte proliferation upon stimulation by mitogens as well as on IFN γ production by these cells [19]. Other studies have reported the regulatory potential of lactoferrin on myelopoiesis by its suppressive activities on many cells including lymphocytes, macrophages and monocytes [38-40]. These processes are regulated by cytokines indicating that lactoferrin could act as a regulatory nutrient by controlling the cytokine production. The potential of lactoferrin to modulate immunity via regulation of cytokines has previously been demonstrated [41].

Lactoferrin also exhibits an immunostimulatory potential. It is demonstrated that this protein encourages the differentiation of T and B lymphocytes [42, 43]. The incubation of immature T lymphocytes in presence of lactoferrin allows for the differentiation of these cells in CD4+ helper T cells and the immune response of sheep red blood cells increases [42]. Natural killer (NK) cells as well as CD8+ T cells have also increased in circulating cells after consumption of lactoferrin. This observation reveals a protective role in the control of metastasis and tumour because NK cells and CD8+ T cells are important in their inhibition [44, 45]. Debbabi *et al.* have investigated the immune responses induced by repeated oral administration of lactoferrin to mice. IgA and IgG secretions are enhanced in the Peyer's patches and spleen from lactoferrin-fed mice but not in serum [46]. Wang

et al. have also confirmed these observations in a study in which the CD4+, CD8+, asialoGM1+ (marker of NK cells), IgA+ and IgM+ B cells have increased in the small intestine of mice treated by lactoferrin [47]. In this study, lactoferrin also enhances production of IL-18, IFN γ as well as caspase-1 leading to an important stimulation of intestinal immunity. These results suggested that the lactoferrin could act as an immunostimulating factor on the mucosal immune system [46]. The immune effects can be due to an action through gut-associated lymphoid tissue (GALT), where the lactoferrin may bind to epithelial cells or interact with M cells in the Peyer's patches. These interactions in the GALT may lead to the production of cytokines being released in circulation and act systemically on circulating leukocytes.

Controversially, lactoferrin shows an absence of stimulation in B or T cells or in cytokine production (IL-6, TNF-alpha, INF-gamma) in Peyer's patches of newborn mice [48]. The consumption of nutrients by newborns in these studies probably leads to oral tolerance because of the probable absence of early consumption of whey proteins before the experiment. The immune system of newborns was not completely developed and they do not have effective cells for the development of the same immunomodulation than an adult mouse [49].

The phagocytic activity of human neutrophils is increased by the presence of lactoferrin; this activation seems to be the result of specific binding of lactoferrin to neutrophils [50]. After binding, the lactoferrin is probably transported into the nucleus where it activates gene expressions responsible for the activation of the phagocytosis mechanism. It is also demonstrated that the lactoferrin stimulates the production of IL-8 from human neutrophils; IL-8 is a chemokine implicated in the activation of neutrophil activities [51]. In contrast, consumption of lactoferrin by newborn calves does not seem to change the production of superoxide by polymorphonuclears [52]. However, this study was done with newborn calves that received the lactoferrin only over a nine days period, it is possible that the

immunity of these young animals was not be stimulated to activate their polymorphonuclear cells in such a brief period.

Peptides from lactoferrin

The principal lactoferrin-derived peptide studied is lactoferricin, which corresponds to 25 amino acids from its N-terminus. This peptide seems to be responsible for the majority of immune benefits reported for lactoferrin. The activation of phagocytosis as well as production of IL-8 from neutrophils when treated with lactoferrin is also observed when treated with the lactoferricin fraction [50, 51]. It is mentioned above that the production of IL-18, IFN γ as well as caspase-1 are increased by lactoferrin, a response also observed with lactoferricin [47]. Lactoferricin is able to bind CpG motifs and prevents their immunostimulatory effects on B cells [37], suggesting a potential anti-inflammatory role of lactoferricin similar to lactoferrin. Moreover, the lactoferricin peptide has been found to suppress the IL-6 response in a monocytic cell line upon stimulation by lipopolysaccharide [53].

Lactoferricin but not lactoferrin demonstrates an induction of apoptosis in human monocytic leukemic cells in a dose- and time-dependent manner. The apoptosis effect of lactoferricin remains present even if various cytokines and mitogens are added. This effect is correlated with high levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) suggesting that apoptosis-inducing activity is related to production of the intracellular ROS by phagocytic cells [54].

Immunoglobulins

Immunoglobulins (Igs) are present in whey in a proportion of about 10%. IgG1 is the major immunoglobulin found in whey (approximately 75%), followed by IgM, IgA and IgG2. In general, the immunoglobulins possess several immune benefits. The principal role of Igs is to defend organisms against

pathogens and viruses. They are responsible for the activation of the complement, increasing phagocytosis by leucocytes, preventing adhesion of microbes and neutralising viruses and toxins [55]. All of these activities can likely be attributed to whey immunoglobulins. Effectively, Roos *et al.* have demonstrated that ingested Igs retain these immunological activities in the human ileum [56]. It is also demonstrated that an immunoglobulin-like receptor isolated from milk inhibits HIV integrase as well as HIV protease [57].

The immuno-enhancing effects often demonstrated in animals fed with whey proteins can be attributed in part to increases in intracellular glutathione [58]. A study of animals fed with defined whey products has demonstrated that the product containing a higher proportion of immunoglobulins (and BSA) exhibited a better GSH-enhancing effect [3]. GSH is an intracellular antioxidant, which required cysteine, glycine and glutamine for its synthesis. It is important to note that the immunoglobulins possess high levels of cysteine and glutamine.

Bovine serum albumin (BSA)

Bovine serum albumin (BSA) is a good source of essential amino acids and this protein is found in whey in a proportion of 5-10% of the whey protein content. Only a few studies have demonstrated the immunological effects of bovine serum albumin (BSA). GSH production increases when animals are fed with a whey diet containing a higher proportion of BSA. This explain the positive effect of BSA since GSH is responsible for some immune benefits observed with whey products [3]. As with the immunoglobulins, the serum albumin fractions contain glutamine and cysteine amino acids that provide an enhancing effect on GSH production.

Moreover, as with β -lactoglobulin, BSA increases the antibody-forming cells in the spleen of mice immunized with trinitrophenylated ficoll [5].

Glycomacropeptides (GMP)

A peptide release during digestion of casein with the chymosin enzyme has been found in whey in a proportion of about 10%. This is the only casein-derived peptide to be found in whey, all the other peptides from casein remain in the cheese fraction. The glycomacropeptide (GMP) is present in whey only when chymosin is used during the cheese fabrication process. GMP is known to inhibit proliferation of mouse splenocytes as well as cells from Peyer's patches isolated from rabbit upon stimulation with lipopolysaccharides (LPS) and phytohemagglutinin (PHA) [59-61]. These results indicate that this peptide down-regulates the immune system by suppressing T lymphocytes (stimulated by PHA) as well as B lymphocytes (stimulated by LPS). Li and Mine have demonstrated that GMP is a potent immuno-enhancer on macrophage proliferation as well as on phagocytic activity *in vitro* [62]. The second part of this study demonstrated that the immunomodulatory effects of GMP are essentially due to sialic acid. Effectively, when enzymatic treatment removes this fragment, the effects are abolished.

Other effects of whey proteins

The majority of the studies about the immunomodulatory potential of whey proteins are done with whey directly and not with one of individual whey proteins; the effects are therefore associated to whey proteins in general and were not associated to a specific protein.

The immuno-enhancing effect of whey proteins on the formation of specific antibodies is well documented [5, 63-66]. For example, one study demonstrated that mice fed with whey protein concentrate (WPC) express an elevated level of antibodies after the administration of different vaccines via different routes [66]. The same immuno-enhancing effect has been seen by Wong and Watson, in which they have observed higher concentrations of anti-ovalbumin

antibodies in the presence of whey proteins [65]. The same study also demonstrates an increase in cell-mediated immunity after a period of five weeks in contrast with another study [5] this difference, however may be a result of different whey sources as well as the dose and duration of feeding. Variable effects of whey can be attributed to the whey source [67]. It is also demonstrated that whey enhances the proliferation of non-stimulating (mitogens) splenocytes [68].

A hypothesis suggests that the whey may act via the GALT system for the production of antibodies. This hypothesis is supported by the results demonstrating that WPC increases the antibody response in the intestinal tract of mice upon immunization with ovalbumin [69].

Roth *et al.* have demonstrated that the ultrafiltered bovine whey increases the *in vitro* neutrophil functions of cattle cells as well as cytochrome C reduction in cells of dexamethasone-treated cattle indicating that the whey increases the oxidative metabolism of cattle treated with dexamethasone [70]. However, in this study, the whey came from hyperimmunized cows and it is possible that these effects are due to cytokines present and not by whey proteins.

Until now, only immuno-stimulating properties of whey proteins have been discussed but some studies indicate that the whey can be an immunosuppressive agent in some circumstances. *In vitro* studies show an immunosuppression of T and B lymphocyte proliferation upon stimulation with mitogens [19, 71, 72]. Whey proteins also show an immunoregulatory effect in spleen cells since the activation of these cells is down-regulated by oral administration of whey [73]. The increase in TGF- β production in cells after whey treatment may explain this regulation. TGF- β is a cytokine secreted during the tolerance induction and is responsible to the down-regulation against food antigen [49]. These results showed that whey proteins might be a good nutritive

supplement because of its capabilities to modulate immunity, which may help in many different immune diseases.

Other effects of whey peptides

Some effects of whey peptides have been reported but the characterisation of these peptides are not investigated thus the protein associated with the effective peptides are unknown. A hydrolysed whey protein isolate composed of β -lactoglobulin, α -lactalbumin and GMP has shown to possess a stimulatory effect on lymphocyte proliferation *in vitro* [68]. Another peptide, a glycoposphopeptide isolated from cheese whey, has demonstrated a mitogenic activity on splenocytes [74]. It has also been demonstrated that the peptides issued from whey and milk possess a good immunostimulatory effect on keratinocyte growth *in vitro* [75].

Some whey peptides possess also an inhibitory effect on the angiotensin converting enzyme (ACE) [76]. ACE is responsible for inactivation of bradykinin. Bradykinin exhibits an essential role in inflammatory defence by the stimulation of macrophage and cytokine production [55]. Consequently, the peptides that act as an ACE inhibitor stimulate the immune system via macrophage activation.

As mentioned previously, β -lactoglobulin is principally responsible for the milk allergy in children. It has been postulated that the peptides from β -lactoglobulin diminish the allergic reaction to this protein [14]. Many studies have also demonstrated the preventive role against milk-allergy of hydrolysed whey proteins [77-79].

Moreover, many other constituents in milk and whey are known to possess immunomodulatory effects, such as cytokines, growth factors, enzymes and hormones [80-82]. A growth factor derived from whey is known to have a

protective effect on a colitis-animal model [83, 84]. Francis *et al.* have demonstrated that a growth factor isolated from whey improved the growth rate of cells such as epithelial cells and fibroblasts [85, 86]. These results lead them to postulate the hypothesis that whey could be an interesting product against many diseases not only because of their protein or peptide content.

Conclusion

It has known for many years that the consumption of nutraceutical products is important in maintaining general health. In this class of nutrients, milk-derived products have acquired a place of choice in the minds of people. Statistics confirming the important growth in the consumption of these products by the general population show this is indeed the case [87, 88]. Some reviews have already demonstrated, for example, the immunologic effects of milk-derived products such as yogurt [89].

This present review, which emphasizes the reported immune effects of whey proteins and derived peptides, demonstrates an important therapeutic potential of whey products not only for maintaining good general health but also guarding against many immune diseases such as inflammatory disorders as well as autoimmune diseases. All the proteins and peptides present in whey possess an immunomodulatory potential as much in both innate immunity and acquired immunity that provides an excellent mechanism of defence against all infections. The potential of enhancing GSH, NK cells, cytotoxic T cells and the phagocytosis process leads to an enhancement of the capacity to defend against cancer.

Moreover, it is now reported that the lactoferrin (and lactoferricin) provides whey with an important effect against bacterial and autoimmune inflammatory diseases. Many studies prove that whey (and especially lactoferrin) plays a protective role against gastritis, asthma, colitis, arthritis and atopic contact dermatitis. The anti-allergy properties of whey against milk reactions are also

reported in a study with the presence of peptides derived from β -lactoglobulin. These peptides seem to protect against allergies by the stimulation of oral tolerance. This observation is very important because it brings an encouraging perspective of which being that children having consumed whey early on can consume milk (an important nutrient) without the onset of allergies.

Whey products seem to have essential properties and could be used in the treatment of many diseases. Their effects are probably comparable to the effects observed with many medicines and drugs but do so act as a unique natural product. More studies are needed to compare whey products with medicines in the treatment or prevention of diseases.

These products or derived products are part of a future solution in obtaining and maintaining a healthy general immune system and to provide a natural, nutritive and non-chemical supplement against numerous diseases and immune disorders.

Table 1. Specific properties of whey proteins.

PROTEIN	M.W. (g/mol)	IP	CONCENTRATION			OTHER STRUCTURAL PROPERTIES
			MILK (g/L)	WHEY (g/L)	WHEY (%)	
β-lactoglobulin	18 400	5.35- 5.49	2.0-4.0	3.3	55-65	Presence of an hydrophobic region able to bind the vitamin A and help to its absorption
α-lactalbumin	14 200	4.2- 4.5	1.0-1.5	1.2	15-25	Presence of an hydrophobic region that bind galactosyl-transferase and help in lactose biosynthesis
Lactoferrin (Lf)	80 000	8.4- 9.0	0.2	0.2	1-2	Presence of ferric ions binding sites, which permit to the LF bind and transport iron, leading to an important role in iron assimilation
Immunoglobulin	80 000- 900 000	5.5- 8.3	0.4-1.0	0.5	10-15	Five categories of immunoglobulin : IgG1(0.3-0.6g/l), IgG2(0.05-0.1 g/l), IgA(0.05-0.15 g/l), IgM(0.05-0.2 g/l) and IgE
BSA	69 000	4.7- 4.9	0.1-0.4	0.3	5-10	Important capabilities to bind fatty acids

Adapted from: de Wit 1998 [90], Marshall and Harper 1988 [91] and Cayot and Lorient 1998 [92].

Table 2. Immunological effects of whey proteins and peptides.

WHEY FRACTION	REPORTED EFFECT	REFERENCES
β-lactoglobulin	<u>Protein:</u> -Stimulatory effect on splenocytes -Increase GSH <u>Peptides:</u> -Carrier of retinoic acid -Contraction of ileum muscle -Increase oral tolerance to whey	[5, 6] [3] [9] [10, 11] [14]
α-lactalbumin	<u>Protein:</u> -Increase IL-1β production by macrophages - Induces apoptosis in tumor and immature cells <u>Peptides:</u> -Modulation of B and T lymphocytes activities -Stimulation of adherence and phagocytosis of macrophages -Stimulation of oxidative burst response	[19] [20, 21] [5, 25] [22, 23] [22]
Lactoferrin	<u>Protein:</u> -Inhibition of cytokines TNFα, IL-1β and IFNγ -Anti-inflammatory effect on animal model -Up-regulation of cytokine IL-10 -Stimulatory effect on lymphocyte proliferation -Regulatory effect on myelopoiesis -Promote the differentiation of T and B lymphocytes -Increase NK cells, CD8+ cells, CD4+ cells -Bind to CpG and prevent stimulatory effect on B cells -Stimulation of mucosal immunity through Peyer's patches -Increase phagocytosis activity of neutrophils as well as IL-8 <u>Peptides:</u> - Increase phagocytosis activity of neutrophils as well as IL-8	[19, 32, 35, 36] [33-36] [35] [19] [38-40] [42, 43] [44, 45, 47] [37] [46, 47] [50, 51] [50, 51]

	-Bind to CpG and prevent stimulatory effect on B cells -Inhibition of IL-6 production by LPS -Increase of apoptosis in leukemic cells lines via production of ROS by phagocytic cells	[37] [53] [54]
Immunoglobulins	-Increase of GSH -Activation of complement, increase of phagocytosis, prevent adhesion of microbes, neutralize viruses and toxins	[58] [55]
BSA	-Increase of GSH -Stimulatory effect on splenocytes	[3] [5]
GMP	-Suppresses proliferation of cells upon stimulation by mitogens -Stimulation of macrophages proliferation and phagocytosis	[59-61] [62]

References

Papers of special note have been highlighted as :

- of interest
- of considerable interest

1. Tipton KD, Elliott TA, Cree MG, Wolf SE, Sanford AP and Wolfe RR: Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 36(12), 2073-2081 (2004).

2. Kawase M, Hashimoto H, Hosoda M, Morita H and Hosono A: Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. *J Dairy Sci.* 83(2), 255-263 (2000).

3. Bounous G and Gold P: The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. *Clin Invest Med.* 14(4), 296-309 (1991).

• **Good introduction to GSH properties, its role on immunity as well as the effect of whey on GSH production.**

4. Bounous G and Molson JH: The antioxidant system. *Anticancer Res.* 23(2B), 1411-1415 (2003).

5. Bounous G and Kongshavn PA: Differential effect of dietary protein type on the B-cell and T-cell immune responses in mice. *J Nutr.* 115(11), 1403-1408 (1985).

6. Wong KF, Middleton N, Montgomery M, Dey M and Carr RI: Immunostimulation of murine spleen cells by materials associated with bovine milk protein fractions. *J Dairy Sci.* 81(7), 1825-1832 (1998).

7. Brix S, Bovetto L, Fritsche R, Barkholt V and Frokiaer H: Immunostimulatory potential of beta-lactoglobulin preparations: Effects caused by endotoxin contamination. *J Allerg Clin Imm.* 112(6), 1216-1222 (2003).

8. Pellegrini A, Dettling C, Thomas U and Hunziker P: Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine beta-lactoglobulin. *Biochim Biophys Acta.* 1526(2), 131-140 (2001).

9. Guimont C, Marchall E, Girardet JM and Linden G: Biologically active factors in bovine milk and dairy byproducts: influence on cell culture. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 37(4), 393-410 (1997).

10. Yamauchi K: Biologically functional proteins of milk and peptides derived from milk proteins. *International Dairy federation bulletin.* 272, 51-58 (1992).

11. Pihlanto-Leppala A, Paakkari I, Rinta-Koski M and Antila P: Bioactive peptide derived from in vitro proteolysis of bovine beta-lactoglobulin and its effect on smooth muscle. *J Dairy Res.* 64(1), 149-155 (1997).

12. Yoshida T and Owens GK: Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. *Circ Res.* 96(3), 280-291 (2005).

13. Host A: Frequency of cow's milk allergy in childhood. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 89(6 Suppl 1), 33-37 (2002).

14. Pecquet S, Bovetto L, Maynard F and Fritsche R: Peptides obtained by tryptic hydrolysis of bovine beta-lactoglobulin induce specific oral tolerance in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 105(3), 514-521 (2000).

• **Peptides from β -lactoglobulin can protect against allergies to this protein.**

15. Matsumoto H, Shimokawa Y, Ushida Y, Toida T and Hayasawa H: New biological function of bovine alpha-lactalbumin: protective effect against ethanol- and stress-induced gastric mucosal injury in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 65(5), 1104-1111 (2001).

16. Bruck WM, Kelleher SL, Gibson GR, Nielsen KE, Chatterton DEW and Lonnerdal B: rRNA probes used to quantify the effects of glycomacropeptide and alpha-lactalbumin supplementation on the predominant groups of intestinal bacteria of infant rhesus monkeys challenged with enteropathogenic Escherichia coli. *J Pediatr Nutr.* 37(3), 273-280 (2003).

17. Bounous G, Stevenson MM and Kongshavn PA: Influence of dietary lactalbumin hydrolysate on the immune system of mice and resistance to salmonellosis. *J Infect Dis.* 144(3), 281 (1981).

18. Bounous G, Letourneau L and Kongshavn PA: Influence of dietary protein type on the immune system of mice. *J Nutr.* 113(7), 1415-1421 (1983).

19. Wong CW, Seow HF, Husband AJ, Register GO and Watson DL: Effects of purified bovine whey factors on cellular immune functions in ruminants. *Vet Immunol Immunopathol.* 56(1-2), 85-96 (1997).

20. Hakansson A, Andreasson J, Zhivotovsky B, Karpman D, Orrenius S and Svanborg C: Multimeric alpha-lactalbumin from human milk induces apoptosis through a direct effect on cell nuclei. *Exp Cell Res.* 246(2), 451-60 (1999).

21. Svensson M, Hakansson A, Mossberg AK, Linse S and Svanborg C: Conversion of alpha-lactalbumin to a protein inducing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(8), 4221-6 (2000).

22. Gattegno L, Migliore-Samour D, Saffar L and Jolles P: Enhancement of phagocytic activity of human monocytic-macrophagic cells by immunostimulating peptides from human casein. *Immunol Lett.* 18(1), 27-31 (1988).

23. Jaziri M, Migliore-Samour D, Casabianca-Pignede MR, Keddad K, Morgat JL and Jolles P: Specific binding sites on human phagocytic blood cells for Gly-Leu-Phe and Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr, immunostimulating peptides from human milk proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1160(3), 251-261 (1992).

• **Molecular mechanism by which peptides can exert their effects on immune cells.**

24. Migliore-Samour D, Roch-Arveiller M, Tissot M *et al.*: Effects of tripeptides derived from milk proteins on polymorphonuclear oxidative and phosphoinositide metabolisms. *Biochem Pharmacol.* 44(4), 673-680 (1992).

25. Kayser H and Meisel H: Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Lett.* 383(1-2), 18-20 (1996).

26. Pellegrini A, Thomas U, Bramaz N, Hunziker P and von Fellenberg R: Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine alpha-lactalbumin molecule. *Biochim Biophys Acta.* 1426(3), 439-448 (1999).

• **Interesting study about antimicrobial activities of peptides isolated from α -lactalbumin.**

27. Baldwin DA, Jenny ER and Aisen P: The effect of human serum transferrin and milk lactoferrin on hydroxyl radical formation from superoxide and hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 259(21), 13391-13394 (1984).

28. Bezwoda WR and Mansoor N: Lactoferrin from human breast milk and from neutrophil granulocytes. Comparative studies of isolation, quantitation, characterization and iron binding properties. *Biomed Chromatogr.* 3(3), 121-126 (1989).

29. Masson PL and Heremans JF: Lactoferrin in milk from different species. *Comp Biochem Physiol B.* 39(1), 119-129 (1971).

30. Masson PL, Heremans JF and Ferin J: Presence of an Iron-binding protein (lactoferrin) in the genital tract of the human female. I. Its immunohistochemical localization in the endometrium. *Fertil Steril.* 19(5), 679-689 (1968).

31. Masson PL, Heremans JF and Schonke E: Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J Exp Med.* 130(3), 643-658 (1969).

32. Machnicki M, Zimecki M and Zagulski T: Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 in vivo. *Int J Exp Pathol.* 74(5), 433-439 (1993).

33. Dial EJ, Romero JJ, Headon DR and Lichtenberger LM: Recombinant human lactoferrin is effective in the treatment of *Helicobacter felis*-infected mice. *J Pharm Pharmacol.* 52(12), 1541-1546 (2000).

34. Guillen C, McInnes IB, Vaughan D, Speekenbrink AB and Brock JH: The effects of local administration of lactoferrin on inflammation in murine autoimmune and infectious arthritis. *Arthritis Rheum.* 43(9), 2073-2080 (2000).

35. Hayashida K, Kaneko T, Takeuchi T, Shimizu H, Ando K and Harada E: Oral administration of lactoferrin inhibits inflammation and nociception in rat adjuvant-induced arthritis. *J Vet Med Sci.* 66(2), 149-154 (2004).

•• Describes the mechanism by which lactoferrin exerts its anti-inflammatory activity against arthritis.

36. Kimber I, Cumberbatch M, Dearman RJ, Headon DR, Bhushan M and Griffiths CE: Lactoferrin: influences on Langerhans cells, epidermal cytokines, and cutaneous inflammation. *Biochem Cell Biol.* 80(1), 103-107 (2002).

•• Utilization of lactoferrin by topical contact instead of orally in an inflammatory model and good description of its mechanism.

37. Britigan BE, Lewis TS, Waldschmidt M, McCormick ML and Krieg AM: Lactoferrin binds CpG-containing oligonucleotides and inhibits their immunostimulatory effects on human B cells. *J Immunol.* 167(5), 2921-2928 (2001).

38. Broxmeyer HE, DeSousa M, Smithyman A *et al.*: Specificity and modulation of the action of lactoferrin, a negative feedback regulator of myelopoiesis. *Blood.* 55(2), 324-333 (1980).

39. Bagby GC, Jr., Rigas VD, Bennett RM, Vandebark AA and Garewal HS: Interaction of lactoferrin, monocytes, and T lymphocyte subsets in the regulation of steady-state granulopoiesis in vitro. *J Clin Invest.* 68(1), 56-63 (1981).

40. Bagby GC, Jr.: Regulation of granulopoiesis: the lactoferrin controversy. *Blood Cells.* 15(2), 386-399 (1989).

41. Crouch SP, Slater KJ and Fletcher J: Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. *Blood.* 80(1), 235-240 (1992).

42. Zimecki M, Mazurier J, Machnicki M, Wieczorek Z, Montreuil J and Spik G: Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4- CD8- murine thymocytes. *Immunol Lett.* 30(1), 119-123 (1991).

43. Zimecki M, Mazurier J, Spik G and Kapp JA: Human lactoferrin induces phenotypic and functional changes in murine splenic B cells. *Immunology.* 86(1), 122-127 (1995).

44. Sekine K, Ushida Y, Kuhara T *et al.*: Inhibition of initiation and early stage development of aberrant crypt foci and enhanced natural killer activity in male rats administered bovine lactoferrin concomitantly with azoxymethane. *Cancer Lett.* 121(2), 211-216 (1997).

45. Iigo M, Kuhara T, Ushida Y, Sekine K, Moore MA and Tsuda H: Inhibitory effects of bovine lactoferrin on colon carcinoma 26 lung metastasis in mice. *Clin Exp Metastasis.* 17(1), 35-40 (1999).

46. Debbabi H, Dubarry M, Rautureau M and Tome D: Bovine lactoferrin induces both mucosal and systemic immune response in mice. *J Dairy Res.* 65(2), 283-293 (1998).

- **Effect on mucosal immunity of lactoferrin consumption.**

47. Wang WP, Iigo M, Sato J, Sekine K, Adachi I and Tsuda H: Activation of intestinal mucosal immunity in tumor-bearing mice by lactoferrin. *Jpn J Cancer Res.* 91(10), 1022-1027 (2000).

48. Griffiths EA, Duffy LC, Schanbacher FL *et al.*: In vivo effects of bifidobacteria and lactoferrin on gut endotoxin concentration and mucosal immunity in balb/c mice. *Dig Dis Sci.* 49(4), 579-589 (2004).

49. Weiner HL: Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol Today.* 18(7), 335-343 (1997).

50. Miyauchi H, Hashimoto S, Nakajima M, Shinoda I, Fukuwatari Y and Hayasawa H: Bovine lactoferrin stimulates the phagocytic activity of human neutrophils: identification of its active domain. *Cell Immunol.* 187(1), 34-37 (1998).

51. Shinoda I, Takase M, Fukuwatari Y, Shimamura S, Koller M and Konig W: Effects of lactoferrin and lactoferricin on the release of interleukin 8 from human polymorphonuclear leukocytes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 60(3), 521-523 (1996).

52. Dawes ME, Lakritz J, Tyler JW *et al.*: Effects of supplemental lactoferrin on serum lactoferrin and IgG concentrations and neutrophil oxidative metabolism in Holstein calves. *J Vet Int Med.* 18(1), 104-108 (2004).

53. Mattsby-Baltzer I, Roseanu A, Motas C, Elverfors J, Engberg I and Hanson LA: Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells. *Pediatr Res.* 40(2), 257-262 (1996).
54. Yoo YC, Watanabe R, Koike Y *et al.*: Apoptosis in human leukemic cells induced by lactoferricin, a bovine milk protein-derived peptide: involvement of reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun.* 237(3), 624-628 (1997).
55. Janeway CA and Travers P: Immunobiologie. De Boeck et Larcier Editor, Paris, 582 pages (1996).
56. Roos N, Mahe S, Benamouzig R, Sick H, Rautureau J and Tome D: ¹⁵N-labeled immunoglobulins from bovine colostrum are partially resistant to digestion in human intestine. *J Nutr.* 125(5), 1238-1244 (1995).
57. Ng TB and Ye XY: A polymeric immunoglobulin receptor-like milk protein with inhibitory activity on human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Int J Bioch Cell Biol.* 36(11), 2242-2249 (2004).
58. Bounous G, Batist G and Gold P: Immunoenhancing property of dietary whey protein in mice: role of glutathione. *Clin Invest Med.* 12(3), 154-161 (1989).
59. Otani H, Monnai M and Hosono A: Bovine kappa-casein as inhibitor of the proliferation of mouse splenocytes induced by lipopolysaccharide stimulation. *Milchwissenschaft.* 47, 512-515 (1992).
60. Otani H and Hata I: Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes and rabbit Peyer's patch cells by bovine milk caseins and their digests. *J Dairy Res.* 62(2), 339-348 (1995).
61. Otani H, Monnai M, Kawasaki Y, Kawakami H and Tanimoto M: Inhibition of mitogen-induced proliferative responses of lymphocytes by bovine kappa-caseinoglycopeptides having different carbohydrate chains. *J Dairy Res.* 62(2), 349-357 (1995).
62. Li EW and Mine Y: Immunoenhancing effects of bovine glycomacropeptide and its derivatives on the proliferative response and

phagocytic activities of human macrophagelike cells, U937. *J Agric Food Chem.* 52(9), 2704-2708 (2004).

63. Bounous G, Shenouda N, Kongshavn PA and Osmond DG: Mechanism of altered B-cell response induced by changes in dietary protein type in mice. *J Nutr.* 115(11), 1409-1417 (1985).

64. Bounous G, Kongshavn PA and Gold P: The immunoenhancing property of dietary whey protein concentrate. *Clin Invest Med.* 11(4), 271-278 (1988).

65. Wong CW and Watson DL: Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. *J Dairy Res.* 62(2), 359-368 (1995).

66. Low PPL, Rutherford KJ, Gill HS and Cross ML: Effect of dietary whey protein concentrate on primary and secondary antibody responses in immunized BALB/c mice. *Int Immunopharmacol.* 3(3), 393-401 (2003).

- **Potential of whey to act as an oral adjuvant in vaccination.**

67. Middleton N, Reid JR, Coolbear T and Jelen P: Proliferation and intracellular glutathione in Jurkat T cells with concentrated whey protein products. *Int Dairy J.* 13(7), 565-573 (2003).

68. Mercier A, Gauthier SF and Fliss L: Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. *Int Dairy J.* 14(3), 175-183 (2004).

69. Low PPL, Rutherford KJ, Cross ML and Gill HS: Enhancement of mucosal antibody responses by dietary whey protein concentrate. *Food Agri Imm.* 13, 255-264 (2001).

70. Roth JA, Frank DE, Weighner P and Weighner M: Enhancement of neutrophil function by ultrafiltered bovine whey. *J Dairy Sci.* 84(4), 824-829 (2001).

71. Otani H and Odashima M: Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes by lacto- and ovotransferrins. *Food Agri Imm.* 9, 193-201 (1997).

72. Cross ML and Gill HS: Modulation of immune function by a modified bovine whey protein concentrate. *Immunol Cell Biol.* 77(4), 345-350 (1999).

73. Penttila IA, Zhang MF, Bates E, Regester G, Read LC and Zola H: Immune modulation in suckling rat pups by a growth factor extract derived from milk whey. *J Dairy Res.* 68(4), 587-599 (2001).

74. Yun SS, Sugita-Konishi Y, Kumagai S and Yamauchi K: Isolation of mitogenic glycoposphopeptides from cheese whey protein concentrate. *Biosci Biotechnol Biochem.* 60(3), 429-433 (1996).

75. Amiot J, Germain L, Turgeon S, Lemay M, OrySalam C and Auger FA: Peptides from milk protein hydrolysates to improve the growth of human keratinocytes in culture. *Int Dairy J.* 14(7), 619-626 (2004).

76. Murakami M, Tonouchi H, Takahashi R *et al.*: Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (beta-lactosin B) isolated from a commercial whey product. *J Dairy Sci.* 87(7), 1967-74 (2004).

77. Han YS, Park HY, Ahn KM, Lee JS, Choi HM and Lee SI: Short-term effect of partially hydrolyzed formula on the prevention of development of atopic dermatitis in infants at high risk. *J Korean Med Sci.* 18(4), 547-551 (2003).

• **Clinical study that proves that hydrolyzed whey formula can protect against allergies.**

78. Tanabe S, Tesaki S, Watanabe J, Fukushi E, Sonoyama K and Kawabata J: Isolation and structural elucidation of a peptide derived from Edam cheese that inhibits beta-lactoglobulin transport. *J Dairy Sci.* 86(2), 464-468 (2003).

79. Peng HJ, Su SN, Tsai JJ, Tsai LC, Kuo HL and Kuo SW: Effect of ingestion of cow's milk hydrolysed formulas on whey protein-specific Th2 immune responses in naive and sensitized mice. *Clin Exp Allergy.* 34(4), 663-670 (2004).

80. Grosvenor CE, Picciano MF and Baumrucker CR: Hormones and growth factors in milk. *Endocr Rev.* 14(6), 710-728 (1993).

81. Garofalo RP and Goldman AS: Cytokines, chemokines, and colony-stimulating factors in human milk: the 1997 update. *Biol Neonate.* 74(2), 134-142 (1998).

82. Rowlands JC, He L, Hakkak R, Ronis MJ and Badger TM: Soy and whey proteins downregulate DMBA-induced liver and mammary gland CYP1 expression in female rats. *J Nutr.* 131(12), 3281-3287 (2001).

83. Procaccino F, Reinshagen M, Hoffmann P *et al.*: Protective effect of epidermal growth factor in an experimental model of colitis in rats. *Gastroenterology.* 107(1), 12-17 (1994).

84. Porter SN, Howarth GS and Butler RN: An orally administered growth factor extract derived from bovine whey suppresses breath ethane in colitic rats. *Scand J Gastroenterol.* 33(9), 967-974 (1998).

85. Francis GL, Register GO, Webb HA and Ballard FJ: Extraction from cheese whey by cation-exchange chromatography of factors that stimulate the growth of mammalian cells. *J Dairy Sci.* 78(6), 1209-1218 (1995).

86. Rogers ML, Belford DA, Francis GL and Ballard FJ: Identification of fibroblast growth factors in bovine cheese whey. *J Dairy Res.* 62(3), 501-507 (1995).

87. Hilliam M: The market for functional foods. *Int Dairy J.* 8, 349-353 (1998).

88. Milner JA: Functional foods: the US perspective. *Am J Clin Nutr.* 71(6 Suppl), 1654S-1659S (2000).

89. Meydani SN and Ha WK: Immunologic effects of yogurt. *Am J Clin Nutr.* 71(4), 861-872 (2000).

90. de Wit JN: Marschall Rhone-Poulenc Award Lecture. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J Dairy Sci.* 81(3), 597-608 (1998).

●● **Good overview of the characteristics of the different whey proteins.**

91. Marshall KR and Harper WJ: Trends in utilization of whey and whey derivatives. *Bulletin of the international dairy federation.* 233, 21-32 (1988).

92. Cayot P and Lorient D: Structures et technofonctions des protéines du lait. Arilait Recherches Editor, Paris, 363 pages (1998).

CHAPITRE 4 : ARTICLE II

4.1 Mise en contexte

La littérature scientifique démontre très bien que les protéines et peptides de lactosérum ainsi que les probiotiques possèdent de nombreux effets immunomodulateurs. De part sa composition et la synergie de ses constituants, la Matrice Protéique Malléable est susceptible d'exhiber un potentiel immunomodulateur intéressant.

Le but de cette étude était de démontrer les effets de la MPM sur le système immunitaire. Des animaux immunocompétents ont été gavés avec la MPM durant une période de 3 semaines. Plusieurs paramètres ont été évalués dans le sang et les organes tout au long de l'expérience afin de déterminer les impacts de la consommation de MPM sur le système immunitaire.

Les objectifs de cette étude étaient :

- i) Évaluer le potentiel immunomodulateur de la MPM.
- ii) Déterminer quelle(s) voie(s) immunitaire(s) sont stimulé et/ou supprimé par la consommation de la MPM.
- iii) Identifier un potentiel de traitement de maladie immunitaire pour la poursuite de la caractérisation des effets immunomodulateur de la MPM.

4.2 Contribution des auteurs

Nicolas Beudet a développé le modèle de gavage des animaux sains et déterminer les doses quotidiennes à donner aux animaux. Il a aussi identifier l'augmentation des leucocytes totaux. Roger Dubuc a développé la méthode d'évaluation des niveaux de glutathion sanguin et est responsable de ces résultats dans l'article. J'ai effectuée toutes les expériences de gavages et de prélèvements sanguins chez les animaux et je suis responsable de toutes les autres expériences effectuées dans l'article. J'ai aussi rédigé l'article et effectué les corrections. Claude Dupont et Pierre Lemieux m'ont dirigé dans la planification des expériences et dans la correction de l'article.

4.3 Résumé français

Immunomodulation by a malleable matrix composed of fermented whey proteins and lactic acid bacteria.

Josée Beaulieu^{1,2}, Roger Dubuc¹, Nicolas Beaudet^{1,3}, Claude Dupont¹ and Pierre Lemieux^{2*}.

1. Institut national de la recherche scientifique, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7.
2. Technologie Biolactis, 500 boul. Cartier suite 218, Laval, Quebec, Canada, H7V 5B7.
3. Université de Sherbrooke, Département de Physiologie et biophysique, 3001 12^e Ave Nord, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4

Les aliments fonctionnels et nutraceutiques connaissent un succès considérable depuis les 10 dernières années. Parmi ces produits de santé naturelle se retrouve les protéines de lactosérum et les laits fermentés. La Matrice Protéique Malléable (MPM), composée de lactosérum fermenté par une souche de bactéries lactiques, d'exopolysaccharides capsulaires, de vitamines, minéraux et de peptides générés durant le procédé de fermentation, possède l'avantage d'être unique et de combiner de multiples composants bénéfiques pour la santé. Des expériences de gavage chez des animaux sains ont été effectuées pour évaluer les effets immunomodulateurs de la MPM. La production de glutathion, d'anticorps et la modulation des populations leucocytaires ont été suivis. Il y a évidence de la stimulation du système immunitaire par la consommation de MPM comme démontré par l'augmentation des cellules polymorphonucléaires sanguines et les niveaux de glutathion intracellulaire. L'absence de production d'anticorps spécifiques aux MPM indique une absence de reconnaissances immunitaires indésirables de la MPM. La MPM, de part ses effets immunomodulateurs,

possède le potentiel de devenir un intéressant substitut alimentaire ou un aliment fonctionnel pour maintenir ou améliorer le système immunitaire inné.

Article publié dans : *Journal of Medicinal Food*, 2007. 10(1):67-72.

Reproduit avec la permission de Mary Ann Liebert *inc.*, publishers.

4.4 Immunomodulation by a malleable matrix composed of fermented whey proteins and lactic acid bacteria.

JOURNAL OF MEDICINAL FOOD

J Med Food 10 (1) 2007, xxx–xxx

© Mary Ann Liebert, Inc. and Korean Society of Food Science and Nutrition

BEAULIEU ET AL.

IMMUNOMODULATION BY WHEY PROTEINS

Immunomodulation by a Malleable Matrix Composed of Fermented Whey Proteins and Lactic Acid Bacteria

Josée Beaulieu,^{1,2} Roger Dubuc,¹ Nicolas Beaudet,^{1,3} Claude Dupont,¹ and Pierre Lemieux²

¹*Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier;*

²*Technologie Biolactis, Laval; and* ³*Département de Physiologie et Biophysique, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada*

Manuscript received 16 June 2006. Revision accepted 10 October 2006.

Address reprint requests to: Pierre Lemieux, Ph.D., Technologie Biolactis, 500

Boulevard Cartier, Suite 218, Laval, Québec, Canada, H7V 5B7, E-mail:

plemieux@biolactis.com

ABSTRACT

Functional foods and nutraceuticals have gained in popularity over the last 10 years. Among natural health products, whey proteins and fermented milk products are paramount. A malleable protein matrix (MPM), composed of whey fermented by a lactic acid bacterium, capsular exopolysaccharides, vitamins, minerals, and peptides generated during the fermentation process, has the potential to be unique by combining multiple health-promoting components. Forced feeding experiments on healthy animals were performed to evaluate the immunomodulatory effect of MPM. Glutathione production, antibody response, and the modulation of leukocyte populations were monitored. The stimulation of the immune system by MPM consumption was evident as seen by the increased polymorphonuclear cell counts and intracellular glutathione levels. The absence of MPM-specific antibody production indicated a lack of undesirable immune recognition of MPM. The MPM, with its immunomodulatory properties, has the potential to be a food substitute or a functional food for maintenance of general immune health.

KEY WORDS: • *antioxidant* • *innate immunity* • *nutraceuticals* • *probiotics*

INTRODUCTION

There is growing evidence that modern life-style and in particular malnutrition have a direct negative impact on immune homeostasis and on the decline of white blood cell counts.¹ Nutraceutical products and functional foods are known to counteract this impact and maintain immune balance.² Milk- and whey-derived products, which are known for their positive effects including modulation of the immune system,³ are prime examples. It has been demonstrated that these products exhibit an antioxidant potential by increasing glutathione contents,^{4,5} act as anti-inflammatory⁶ and anti-allergic^{6,7} agents, and exhibit immunomodulatory potential.^{3,8-13} Specifically, whey proteins, principally lactoferrin, exert their immunomodulatory potential by stimulating the phagocytosis process by human neutrophils and the production of interleukin (IL)-8.⁹ Lactoferrin also possesses anti-inflammatory effects in animal models by stimulation of regulatory IL-10 production.⁷⁻¹⁴ The whey proteins β -lactoglobulin, bovine serum albumin, and α -lactalbumin stimulate immune cell production.¹¹⁻¹⁵ The presence of peptides in whey-derived products depends of the formulation process. Some studies indicate that whey peptides exert also immunomodulatory potential; however, this research is relatively recent, and many other effects could be attributed to the presence of whey peptides.³ Studies indicate that whey peptides stimulate lymphocyte production and activity and increase secretory immunoglobulin (Ig) A production in Peyer's patches.¹³⁻¹⁶

Lactic acid bacteria (LAB), commonly known as probiotics, are also functional foods that possess many immunomodulatory effects. The genus *Lactobacillus*, the most studied of these probiotics, is commonly used in the milk fermentation process.¹⁷ It has also been demonstrated that the effects of probiotics in synergy with food ingredients could be more intense than the probiotics alone.¹⁸ The effects of LAB are strain-dependent, but many *Lactobacillus* strains act on Peyer's patches to stimulate the production of secretory IgA, help phagocytosis, and exhibit anti-inflammatory action by

regulation of cytokine production and anti-allergic potential by reduction of IgE production.¹⁹⁻²² LAB increase the production of a large variety of cytokines depending on the strain used; some increase the Th1 profile, while others increase the Th2 profile.²³

A novel whey-derived ingredient, the malleable protein matrix (MPM), is obtained from whey fermented by *Lactobacillus kefiranofasciens* strain R2C2 isolated from kefir grains.²⁴ The final product, MPM, is composed principally of fermented whey proteins and LAB. Also present in MPM are exopolysaccharides produced by strain R2C2, niacin, riboflavin, a high proportion of calcium, and peptides generated during the fermentation process. The MPM composition is completely reported in Table 1. As mentioned, all the major components of MPM are known for their immunomodulatory potential. Moreover, the vitamins niacin and riboflavin as well as calcium have been proven to have immunomodulatory effects.²⁵⁻²⁷

The objective of this present study is to evaluate the immunomodulatory potential of the MPM. The composition of MPM points to an eventual immunomodulatory effect; however, it is conceivable that it will possess an elevated immunomodulatory potential. This potential has been evaluated using a healthy rat model.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Humid and lyophilized MPM fractions were obtained from Technologie Biolactis Inc. (LaBaie, QC, Canada). MPM was given orally in either its original humid form or reconstituted. Lyophilized MPM required reconstitution in water (20 g of lyophilized MPM:80 mL of water) corresponding to the original MPM water content. Final reconstitution was completed by mixing for 2 minutes with a

blender at maximum speed. The final reconstituted product was stable at 4°C for at least 1 month in sterile environment. The whey isolate product, HMS90, was obtained from Immunocal (Montreal, QC, Canada) and reconstituted in accordance with the manufacturer's instructions. Danone light natural yogurt was used undiluted in some experiments.

Animals

Wistar or Lewis female rats were obtained from Charles River Laboratories (St-Constant, QC, Canada) and used at 7 weeks of age for studies in healthy rats. The animals were housed in filter-top isolator cages in a room kept at 20–23°C with humidity maintained between 35% and 45% and a 12-hour light–dark cycle with free access to a standard laboratory pelleted diet (Rodent Lab Diet 5001, Ren's Feed & Supplies Ltd., Oakville, ON, Canada). The experimental protocols used were approved by the Animal Care Committee of the Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier (Comité Institutionnel des Soins aux Animaux et de Leur Utilisation) (Laval, QC, Canada) and were performed in accordance with the recommendations of the Canadian Council on Animal Care as specified in the National Institutes of Health's *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*.

Total white blood cell counts

Four groups of Lewis rats ($n = 5$) were given *per os* 1 mL of saline, humid MPM, reconstituted HMS90 or yogurt twice a day for 4 days. On day 4, 0.5 mL of blood was collected by jugular puncture, and total white blood cells were counted by confocal microscopy (microscope from Leitz, Wetzlar, Germany) following a blood treatment with Unopette® brand capillary pipettes (Becton Dickinson, San Diego, CA) in accordance with the manufacturer's instructions.

Distinctive white blood cell counts

Two groups of Wistar rats ($n = 6$) were given *per os* 1 mL of water or humid MPM twice a day for 4 days. Blood was collected (0.5 mL) by jugular

puncture at day 4. The lymphocyte, monocyte, and polymorphonuclear (PMN) cells were identified with biotin anti-rat CD45-specific marker and streptavidin-PE-Cy5 to complete the reaction (BD Biosciences Pharmingen, San Diego). The red blood cells were lysed with Optilyse[®] C (Beckman Coulter, Fullerton, CA) in accordance with the manufacturer's instructions. The cell counts were obtained by passage of 20 µL of preparation in an Epics[®] XL[™] flow cytometer (Beckman Coulter). The lymphocytes, monocytes, and PMN cells were separated in accordance with size and surface expression level of CD45.

Total and MPM-specific antibody production

Four groups of Wistar rats ($n = 6$) were given *per os* 1 mL of water, humid MPM, lyophilized MPM, or reconstituted HMS90 twice a day for 18 days. After 18 days, 1 mL of blood was collected by jugular puncture, and the antibody levels were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay.

For the total antibody production, 1:100–1:15,000 serum dilutions in carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) (Sigma-Aldrich Canada, Oakville) were incubated in a 96-well microplate for 1 hour at 37°C and after that overnight at 4°C. The plate was washed twice with Tris-buffered saline-Tween 20 (0.1%) buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl, and 0.05% Tween 20]. After incubation with blocking reagent solution (Roche Diagnostics, Montreal), anti-rat IgG peroxidase-labeled antibody (Sigma-Aldrich Canada) was added, and the plate was incubated for 2 hours at 37°C followed by addition of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) substrate (ABTS) (Sigma-Aldrich Canada) diluted in phosphate-citrate buffer (Sigma-Aldrich Canada). The total antibody production was evaluated by optical density at 405 nm after 15, 30, and 45 minutes of incubation at 37°C.

For the determination of MPM-specific antibody production, the MPM diluted 1:100 in carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) was incubated for 1 hour at 37°C and after that overnight at 4°C. The plate was washed twice with Tris-

buffered saline-Tween 20 (0.1%) buffer. After the incubation with blocking reagent solution (Roche Diagnostics), 1:2–1:50 serum dilutions in phosphate-buffered saline were added to the plate and incubated for 2 hours at 37°C. Anti-rat IgG peroxidase-labeled antibody (Sigma-Aldrich Canada) was then added and incubated for 2 hours at 37°C, followed by addition of ABTS substrate diluted in phosphate-citrate buffer. The MPM-specific antibody production was evaluated by optical density at 405 nm after 15, 30, and 45 minutes of incubation at 37°C.

Determination of intracellular reduced glutathione (GSH) contents

Four groups of Wistar rats ($n = 6$) received *per os* 1 mL of water, humid MPM, lyophilized MPM, or reconstituted HMS90 twice a day for 18 days. After 18 days, 1 mL of blood was collected by jugular puncture. The method used for the determination of GSH contents is modified from those reported by Anderson²⁸ and Tietze.²⁹ The red blood cells were mixed vigorously with 15% sulfosalicylic acid dihydrate (Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada). After centrifugation, the supernatant was diluted in 5% sulfosalicylic acid dihydrate. The GSH reaction was done with distilled water, NADPH tetrasodium salt (Roche, Laval), 5',5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (Sigma-Aldrich Canada), and glutathione reductase (Roche, Laval) in a ratio of 16.5:70:10:1, respectively. Samples of 50 μL were analyzed *in continu* at an optical density of 412 nm for 20 minutes with a spectrophotometer (Varian Cary 300, Varian, St-Laurent, QC, Canada). The results were reported on a GSH standard curve (Sigma-Aldrich Canada).

Statistical analysis

The experiments in healthy rats were performed with a minimal number of six rats per group. The statistical analysis of data was done with the *t* test using Sigma Plot analysis software (Systat Software, San Jose, CA).

RESULTS

The MPM is a whey-fermented product that should possess, by its composition (Table 1), an interesting immunomodulatory potential. The objective of this study was to demonstrate this potential by the use of healthy rats. Figure 1 shows that following a 4-day period of product consumption, the MPM increases the level of white blood cells 1.8-fold in normal healthy rats compared to the control group. Moreover, the effect of MPM suggests that it possesses a better immunomodulatory effect than other commercial whey and milk protein-based products such as HMS90 or regular yogurt (Fig. 1). Indeed, whey isolates HMS90 increased the total white blood cell count only 1.2-fold compared to the control group, while yogurt showed a reduction in total white blood cell count.

The type of immune cells being increased after MPM consumption was also evaluated. Figure 2 demonstrates that the increase in white blood cell production previously observed is associated with a specific increase in PMN circulating cells. The MPM consumption stimulates the PMN production by 1.8-fold compared to the control group at day 4. These results correlate with the increase in total white blood cell counts previously observed and demonstrate that it is specifically associated with PMN counts since MPM consumption increases total white blood cells (Fig. 1) and the PMN counts (Fig. 2) identically after 4 days. No stimulation in lymphocyte cells or monocyte cells was observed upon MPM consumption.

MPM consumption does not influence the antibody production. The total antibody level remained unchanged after consumption of MPM, and no difference was observed between groups (data not shown). The MPM-specific antibody production was evaluated to confirm the absence of allergens or immune recognition of MPM following its consumption. No MPM-specific antibody production was observed in any group (data not shown). This result confirms that

the lack of previous consumption of MPM by the rats does not lead to an undesirable reaction toward MPM.

The MPM exhibits an antioxidant potential as shown by an increase of 1.25-fold in intracellular GSH content (Fig. 3). Moreover, the GSH content following MPM consumption showed a similar result to that observed with consumption of the HMS90 control, which is recognized as a strong GSH enhancer product.³⁰

DISCUSSION

Leukocytes, also referred as white blood cells, are implicated in immune defense. The number and activity of these cells are variable between individuals and are associated with a number of factors, including age, levels of preliminary exposure to antigens, individual health, etc.³¹ Nutrition is also an important factor in the development of an appropriate defense by the immune system. It is well known that many foods exert stimulatory effects on immunity, including, notably, yogurt containing LAB.³²

The MPM contains many ingredients; including whey proteins and peptides, LAB and their exopolysaccharides, group B vitamins, and calcium (Table1). All these ingredients have demonstrated known effects on the immune system.^{3,10,11,27,33,34} Thus, it was expected that the MPM would also exert an immunomodulatory potential, possibly greater than the sum of its parts, due to a synergistic effect between the constituents that would contribute to the beneficial effect observed with MPM consumption.

Stimulation of the production of total white blood cells was the first evidence of an immunomodulation by the MPM. The total white blood cell counts in healthy rats fed with MPM was compared to those in rats fed with yogurt (Danone) or whey isolate protein HMS90 (Immunocal). Lewis rats

showed an increase of 1.8-fold in the total white blood cell count, confirming the immunostimulatory effect of the MPM on total leukocyte production. It was then important to determine which leukocyte population (lymphocytes, monocytes, or PMN cells) was specifically stimulated. To investigate the modulation of leukocyte subpopulations, Wistar rats were used. The combination of anti-rat CD45 antibody expression and size separation using flow cytometry allowed separation of the three populations. Only the PMN population was stimulated by the MPM consumption (Fig. 2). These immune cells are the most important cells implicated in innate immune defense since they are implicated principally in pathogen recognition and destruction by the phagocytosis process.³¹ These cells also possess an important role in adaptive immune defense due to their function as antigen presenting cells to lymphocytes. The MPM permits a stimulation of innate immunity and could help in the role of antigen presenting cells by the PMN cells. Consequently, the organism will have a better nonspecific and perhaps specific protection against pathogen invasion.³¹ The increase in PMN circulating cells suggests that the MPM would be a good supplement to stimulate innate immunity in healthy people and could be beneficial for immunosuppressed individuals.

It was important to demonstrate that this PMN augmentation was not associated with a negative immune reaction against the MPM. The first indication is that the augmentation of leukocyte count is not associated with animals that have not previously consumed whey proteins. The composition of Rodent Lab Diet 5001 is defined with a significant proportion of whey proteins (2–3% of dried whey). Second, the absence of MPM-specific antibody production confirmed the absence of undesirable reaction toward MPM. Although the total antibody level is not enhanced by MPM consumption, the potential of MPM to act as a natural oral adjuvant in specific antibody production following vaccination remains and will be the basis of future experiments. The antioxidant potential, demonstrated by GSH content, is another indication of the immunomodulatory effect of MPM (Fig. 3). It is known that GSH is a natural

intracellular antioxidant very efficient in neutralizing free radicals but also has an important role in immunity. The antioxidant functions permit health maintenance and prevention against diseases.³⁵ An elevated level of GSH permits the organism to produce more leukocytes and, consequently, permits activation of immune defense.⁴ GSH is a well-known natural antioxidant, neutralizing free radicals, and has multiple health benefits especially in cancer prevention and in AIDS by means of its stimulatory effect on basic functions of immune cells.⁴ The same benefits would be expected upon MPM consumption. The whey protein isolate HMS90 stimulated the production of GSH but in the absence of leukocyte stimulation. Reports indicate that whey protein isolates generally exert their immunomodulatory effect on splenocyte proliferation^{36,37} or humoral stimulation following antigen immunization.^{12,38,39} Conversely, the MPM showed an immunostimulatory potential on innate immunity by stimulation of circulating cells without previous antigen stimulation. The effect of the MPM is different than that associated with whey isolate products, indicating that MPM's complex composition exhibits a synergic effect. This immunostimulatory capacity indicates that the MPM would also be a good candidate for studies in the prevention of diseases by its general effect on immunity.

In conclusion, the MPM represents a good nutraceutical that would permit stimulation of the innate immune defense in the case of healthy individuals. This immunostimulatory potential of the MPM could increase general immunity that is required to increase resistance against viruses and pathogenic bacteria, as well as tumors. Although these results are promising, it is important to demonstrate the absence of negative effects associated with the increase in PMN cells as in the case of inflammatory diseases; this will be the focus of future studies with the MPM.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank M. Louis-Philippe Précourt for help in animal studies and result interpretation. François Shareck, Alain Lamarre, and Denis Girard are thanked for the intellectual help in design of animal experiments as well as results interpretation. This study was funded by the National Science and Engineering Research Council of Canada Strategic Grant STP 246405-1. J.B. was a Ph.D. scholar of the Fond de Recherche en Santé du Québec.

TABLE 1. COMPOSITION OF MPM

<i>Composition (g/100 g)</i>	
Humidity	80.0
Protein	8.3
Fat	1.2
Ash (minerals)	5.9
Carbohydrates	4.7
Lactose	2.7
Galactose	0.2
<i>Minerals (mg/100g)</i>	
Potassium	142.9
Sodium	175.2
Calcium	1507.4
Phosphorus	730.3
Selenium	< 0.1
Magnesium	5.4
<i>Oligo-elements (mg/100g)</i>	
Copper	0.07
Iron	0.24
Manganese	0.05
Zinc	0.13
<i>Vitamins (mg or µg/100g)</i>	
Riboflavin (B2)	0.32 mg
Niacin (B3)	1.00 mg
Pyridoxine (B6)	0.04 mg
Cobalamine (B12)	Not detected
Ascorbic acid (C)	Not detected
Folic acid	5 µg
<i>Bacterial count (CFU/100g)</i>	
LAB	6X10 ¹¹

CFU, colony-forming units.

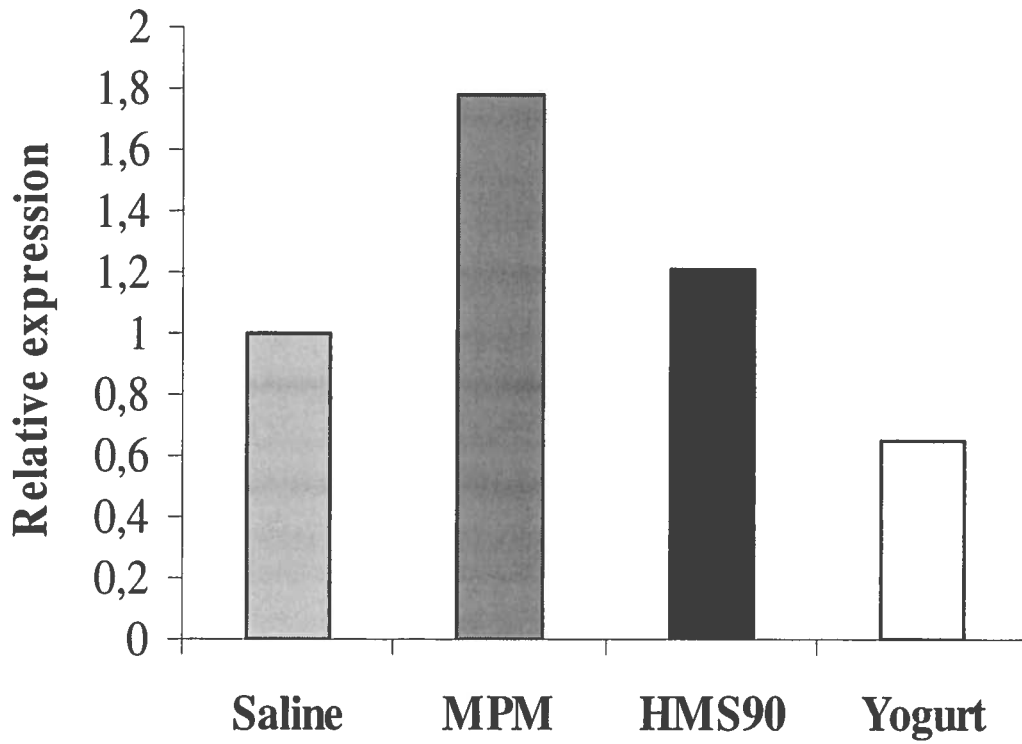


FIG. 1. Circulating total leukocyte counts in healthy rats, following a 4-day peroral administration.

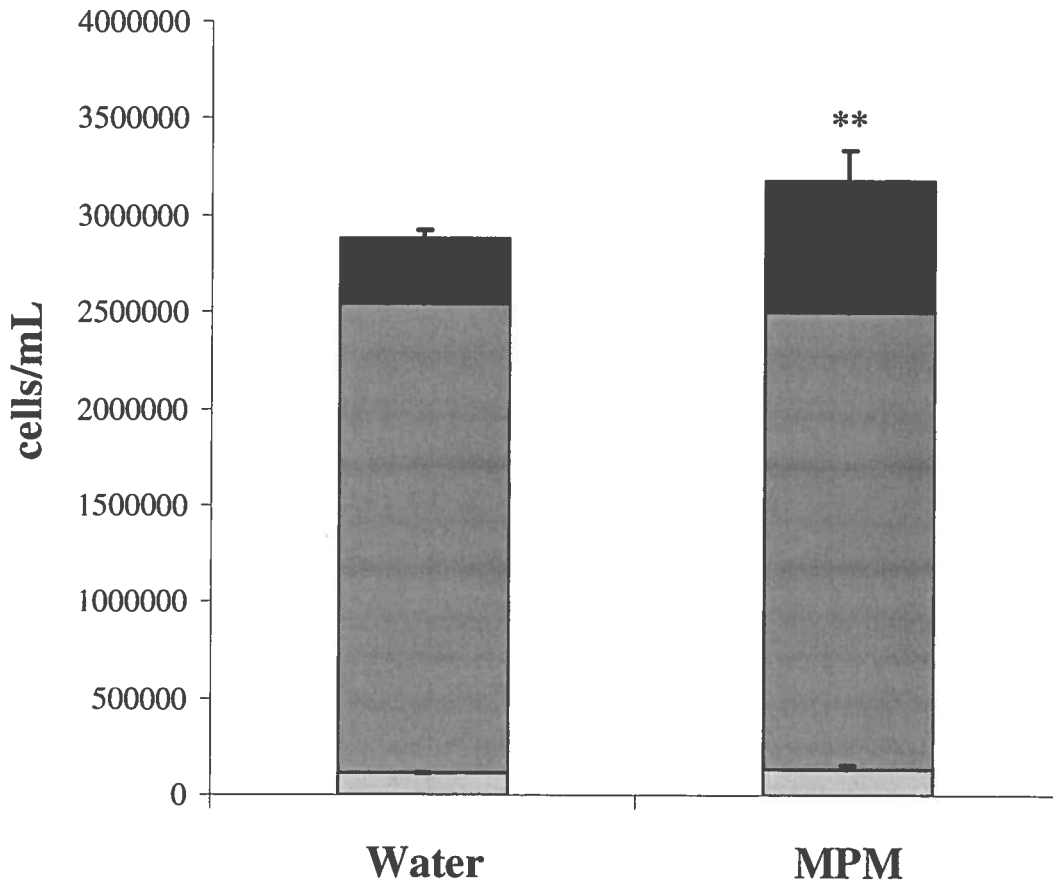


FIG. 2. Circulating cell counts in healthy rats ($n = 6$) after a 4-day peroral administration: monocyte counts (■), lymphocyte counts (■), and PMN counts (■). $**P < .01$.

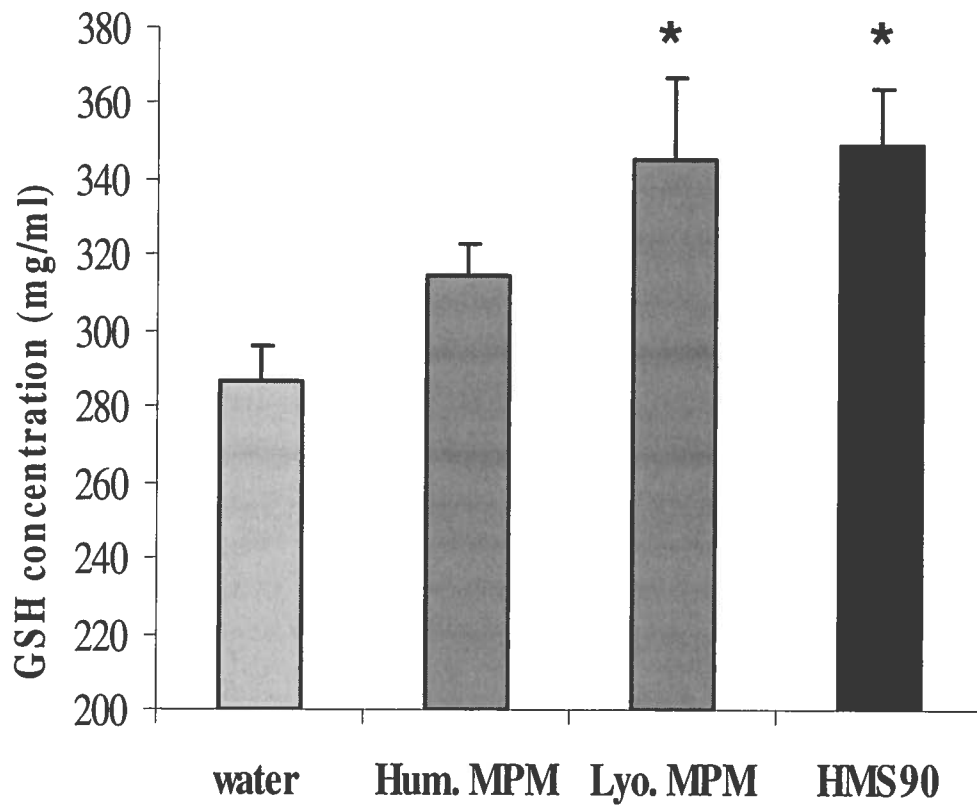


FIG. 3. Intracellular GSH content in white blood cells from healthy rats ($n = 6$), following a 18-day peroral administration. Hum., humidified; Lyo., lyophilized. * $P < .05$.

REFERENCES

1. Singh M: Role of micronutrients for physical growth and mental development. *Indian J Pediatr* 2004;71:59–62.
2. Calder PC, Kew S: The immune system: a target for functional foods? *Br J Nutr* 2002;88(Suppl):S165–S176.
3. Beaulieu J, Dupont C, Lemieux P: Whey proteins and peptides: beneficial effects on immune health. *Therapy* 2006;3:1–10.
4. Bounous G, Gold P: The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. *Clin Invest Med* 1991;14:296–309.
5. Kent KD, Harper WJ, Bomser JA: Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cells. *Toxicol In Vitro* 2003;17:27–33.
6. Kano H, Mogami O, Uchida M: Oral administration of milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1037R-1 to DBA/1 mice inhibits secretion of proinflammatory cytokines. *Cytotechnology* 2002;40:67–73.
7. Ward PP, Uribe-Luna S, Conneely OM: Lactoferrin and host defense. *Biochem Cell Biol* 2002;80:95–102.
8. Cross ML, Gill HS: Modulation of immune function by a modified bovine whey protein concentrate. *Immunol Cell Biol* 1999;77:345–350.
9. Miyauchi H, Hashimoto S, Nakajima M, Shinoda I, Fukuwatari Y, Hayasawa H: Bovine lactoferrin stimulates the phagocytic activity of human neutrophils: identification of its active domain. *Cell Immunol* 1998;187:34–37.
10. Migliore-Samour D, Roch-Arveiller M, Tissot M, Jazziri M, Keddad K, Giroud JP, Jolles P: Effects of tripeptides derived from milk proteins on polymorphonuclear oxidative and phosphoinositide metabolisms. *Biochem Pharmacol* 1992;44:673–680.
11. Brix S, Bovetto L, Fritsche R, Barkholt V, Frokiaer H: Immunostimulatory potential of beta-lactoglobulin preparations: effects caused by endotoxin contamination. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:1216–1222.

12. Wong CW, Watson DL: Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. *J Dairy Res* 1995;62:359–368.
13. Gill HS, Doull F, Rutherfurd KJ, Cross ML: Immunoregulatory peptides in bovine milk. *Br J Nutr* 2000;84(Suppl 1):S111–S117.
14. Kimber I, Cumberbatch M, Dearman RJ, Headon DR, Bhushan M, Griffiths CE: Lactoferrin: influences on Langerhans cells, epidermal cytokines, and cutaneous inflammation. *Biochem Cell Biol* 2002;80:103–107.
15. Clare DA, Catignani GL, Swaisgood HE: Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides. *Curr Pharm Des* 2003;9:1239–1255.
16. Matar C, Valdez JC, Medina M, Rachid M, Perdigon G: Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. *J Dairy Res* 2001;68:601–609.
17. Ouwehand AC: Probiotics: time to move beyond Metchnikoff? *Drug Discov Today* 2003;8:1063.
18. Kopp-Hoolohan L: Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Diet Assoc* 2001;101:229–238.
19. Clancy R: Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;38:9–12.
20. Erickson KL, Hubbard NE: Probiotic immunomodulation in health and disease. *J Nutr* 2000;130(Suppl):403S–409S.
21. Kitazawa H, Watanabe H, Shimosato T, Kawai Y, Itoh T, Saito T: Immunostimulatory oligonucleotide, CpG-like motif exists in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NIAI B6. *Int J Food Microbiol* 2003;85:11–21.
22. Chapat L, Chemin K, Dubois B, Bourdet-Sicard R, Kaiserlian D: *Lactobacillus casei* reduces CD8+ T cell-mediated skin inflammation. *Eur J Immunol* 2004;34:2520–2528.
23. Cross ML, Mortensen RR, Kudsk J, Gill HS: Dietary intake of *Lactobacillus rhamnosus* HNOO1 enhances production of both Th1 and Th2 cytokines in antigen-primed mice. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2002;191:49–53.

24. Simard E, Pilote D, Dupont C, Lajoie N, Quet M, Lemieux P, Goyette P, inventors: Malleable protein matrix and uses thereof. U.S. Patent 20060057131. March 16, 2006.
25. Reddy S, Young M, Ginn S: Immunoexpression of interleukin-1beta in pancreatic islets of NOD mice during cyclophosphamide-accelerated diabetes: co-localization in macrophages and endocrine cells and its attenuation with oral nicotinamide. *Histochem J* 2001;33:317–327.
26. Grimble RF: Effect of antioxidative vitamins on immune function with clinical applications. *Int J Vitam Nutr Res* 1997;67:312–320.
27. Meydani SN, Ha WK: Immunologic effects of yogurt. *Am J Clin Nutr* 2000;71:861–872.
28. Anderson ME: Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. In: *Methods in Enzymology, Vol. 113: Glutamate, Glutamine, Glutathione, and Related Compounds* (Meister A, ed.), Academic Press, Orlando, FL, 1985, pp. 548–555.
29. Tietze F: Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969;27:502–522.
30. Lands LC, Grey VL, Smountas AA: Effect of supplementation with a cysteine donor on muscular performance. *J Appl Physiol* 1999;87:1381–1385.
31. Janeway CA, Travers P: *Immunobiologie*, De Boeck et Larcier ed, Paris, 1996, 582 pages.
32. Fandrich F, Zhou X, Schlemminger M, Lin X, Dresske B: Future strategies for tolerance induction: a comparative study between hematopoietic stem cells and macrophages. *Hum Immunol* 2002;63:805–812.
33. Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Saag KG: Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum* 2004;50:72–77.
34. Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P: An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 2002;12:163–171.

35. Bray TM, Taylor CG: Enhancement of tissue glutathione for antioxidant and immune functions in malnutrition. *Biochem Pharmacol* 1994;47:2113–2123.
36. Wong KF, Middleton N, Montgomery M, Dey M, Carr RI: Immunostimulation of murine spleen cells by materials associated with bovine milk protein fractions. *J Dairy Sci* 1998;81:1825–1832.
37. Bounous G, Kongshavn PA: Differential effect of dietary protein type on the B-cell and T-cell immune responses in mice. *J Nutr* 1985;115:1403–1408.
38. Afuwape AO, Turner MW, Strobel S: Oral administration of bovine whey proteins to mice elicits opposing immunoregulatory responses and is adjuvant dependent. *Clin Exp Immunol* 2004;136:40–48.
39. Low PPL, Rutherford KJ, Gill HS, Cross ML: Effect of dietary whey protein concentrate on primary and secondary antibody responses in immunized BALB/c mice. *Int Immunopharmacol* 2003;3:393–401.

CHAPITRE 5. ARTICLE III

5.1 Mise en contexte

Les effets immunomodulateurs de la MPM ont été préalablement démontrés *in vivo* chez des animaux sains. Il a été identifié que la MPM possède un potentiel antioxydant via la stimulation de la production de GSH ainsi qu'une augmentation importante de la production des polymorphonucléaires sanguins. Ces résultats prometteurs indiquent une stimulation du système immunitaire innée. Par ailleurs, il est aussi démontré que certains constituants de la MPM peuvent à la fois exhiber des effets immunomodulateurs et anti-inflammatoires.

Le but de cette présente étude était de démontrer les effets de la MPM dans un modèle inflammatoire afin de s'assurer de l'absence d'effets indésirables lors d'une maladie inflammatoire malgré une stimulation de l'immunité innée en situation saine ainsi que d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire de la MPM. Le modèle de la dermatite de contact a été utilisé chez des animaux gavés avec la MPM et l'hydrocortisone comme contrôle positif. Le degré d'inflammation est facilement quantifiable par la mesure de l'épaisseur de l'oreille. De plus, comme les résultats indiquent un effet anti-inflammatoire intéressant, divers paramètres ont été suivis afin d'évaluer le mécanisme d'action potentiel de la MPM.

Les objectifs de cette étude étaient :

- i) Évaluer le potentiel anti-inflammatoire de la MPM.
- ii) Vérifier la présence ou l'absence d'effets secondaires par la consommation de la MPM dans cette maladie.
- iii) Caractériser le mécanisme impliqué dans l'effet anti-inflammatoire de la MPM en comparaison avec celui d'un glucocorticoïde souvent utilisé dans ce type de pathologie.
- iv) Caractériser l'effet anti-inflammatoire de la MPM quant à l'extravasation des neutrophiles au site inflammatoire.

5.2 Contribution des auteurs

J'ai effectuée toutes les expériences chez les animaux; c'est-à-dire autant l'adaptation du modèle ainsi que toutes manipulations autant animales que *ex vivo* avec les organes des animaux. J'ai aussi rédigé l'article, effectué les expériences complémentaires exigées par les correcteurs ainsi que toutes corrections nécessaires à la rédaction de l'article. Claude Dupont et Pierre Lemieux m'ont dirigé dans la planification des expériences ainsi que dans la rédaction et la correction de l'article.

5.3 Résumé français

Anti-inflammatory potential of a malleable matrix composed of fermented whey proteins and lactic acid bacteria in an atopic dermatitis model.

Josée Beaulieu^{1,2}, Claude Dupont¹ and Pierre Lemieux^{2*}.

1. Institut national de la recherche scientifique, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7.

2. Technologie Biolactis, 500 boul. Cartier suite 218, Laval, Québec, Canada, H7V 5B7.

Introduction :

Depuis plus de 10 ans, les protéines de lactosérum reçoivent de plus en plus de considérations dans le domaine des aliments fonctionnels et nutraceutiques. Dans cet article, un produit innovateur à base de protéines de lactosérum fermentées, la Matrice Protéique Malléable (MPM), a été testée pour son potentiel anti-inflammatoire. Des résultats préliminaires *in vitro* ont démontré que la MPM pourrait exercer des activités anti-inflammatoires *in vivo*.

Méthodes :

Le potentiel anti-inflammatoire systémique de la MPM a été démontré par le modèle de la dermatite atopique de contact induit par l'oxazolone (ACD). Plusieurs paramètres incluant l'épaisseur de l'oreille, les effets secondaires et l'extravasation des neutrophiles ont été suivis.

Résultats :

La MPM possède un effet anti-inflammatoire, dans le modèle ACD, comparable à celui de l'hydrocortisone (contrôle positif). Les souris nourries aux MPM ont démontré une forte réduction de l'inflammation de l'oreille mais une absence d'effets secondaires en comparaison à l'hydrocortisone. La MPM semble avoir le

potentiel de réduire l'extravasation des neutrophiles dans les tissus comme le montre les décomptes de polymorphonucléaires sanguins ainsi que le contenu en myéloperoxidase dans l'oreille.

Conclusion :

L'activité anti-inflammatoire démontrée dans le modèle ACD suggère que le mécanisme d'action des MPM est différent de celui associé à l'hydrocortisone. La MPM pourrait devenir un produit approprié pour les gens souffrant de manifestations dermatologiques associées aux dysfonctions immunitaires comme les allergies, l'eczéma, les dermatites et quelques maladies autoimmunes.

Article publié dans : *Journal of Inflammation*, 2007. March 21. 4:6

Reproduit avec la permission de *Journal of Inflammation* et BioMed Central
Production

5.4 Anti-inflammatory potential of a malleable matrix composed of fermented whey proteins and lactic acid bacteria in an atopic dermatitis model.

Josée Beaulieu^{1,2}, Claude Dupont¹ and Pierre Lemieux^{2*}.

1. Institut national de la recherche scientifique, INRS-Institut Armand-Frappier,
531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7.
2. Technologie Biolactis, 500 boul. Cartier suite 218, Laval, Québec, Canada,
H7V 5B7.

* Corresponding author: Pierre Lemieux, Ph.D

E-mail address:

JB: josee.beaulieu@iaf.inrs.ca

CD: claudedupont@iaf.inrs.ca

PL: plemieux@biolactis.com

Abstract

Background:

Over the last 10 years, whey proteins have received considerable attention in the area of functional foods and nutraceuticals. In this paper, a novel fermented whey protein-based product described as a gel-like Malleable Protein Matrix (MPM) has been tested for its anti-inflammatory activity. Preliminary *in vitro* results have already indicated that MPM could exert such an anti-inflammatory activity.

Methods:

The systemic anti-inflammatory activity of the MPM was explored using the oxazolone-induced atopic contact dermatitis mouse model (ACD). Parameters including ear thickness, side effects as well as neutrophil extravasation were monitored.

Results:

In the ACD model, the MPM exhibited an anti-inflammatory effect comparable to that of hydrocortisone (positive control). Mice fed with MPM showed strong reduction of the ear inflammation while no side effects, as compared to hydrocortisone, were observed. The MPM seemed to reduce neutrophil extravasation in tissue as evidenced by blood polymorphonuclear cells and ear myeloperoxidase content.

Conclusion:

The anti-inflammatory activity demonstrated in the ACD model suggests that the mechanism of action of the MPM is different than that of hydrocortisone and could become a relevant product for people suffering from dermatological manifestations associated with immune dysfunctions such as allergies, eczema, dermatitis, and autoimmune diseases.

Background

Modern life-styles which leads to obesity, stress and inactivity, is a major cause of immunological diseases, particularly those associated with chronic inflammation which are on the upswing during the last decade [1-3]. Many evidences exist that functional foods have protective effects on immune deficiency [4-6] including whey proteins, which can modulate some immune functions [5]. Other studies revealed that whey proteins possess a myriad of activities including antioxidant activity attributed to increasing glutathione content [7, 8], anti-allergic, [9] anti-inflammatory [9-11] and immunomodulatory activities [12-19]. Whey proteins such as β -lactoglobulin (β -LG), bovine serum albumin (BSA) and α -lactalbumin (α -LA) have been shown to stimulate splenocyte proliferation, increase interleukin-1 production by macrophages and increase GSH production [18, 19]. Whey peptides have recently been shown to possess immunomodulatory activities such as a stimulation of lymphocytes, an increasing in phagocytosis process as well as in secretion of immunoglobulin A (IgA) by Peyer's patches [5, 13, 17, 20].

Lactoferrin (LF), a minor whey protein, has been extensively studied. LF assists the phagocytosis process in neutrophils, increases production of interleukin-8 (IL-8) [13] and stimulates immune cell production [15, 19, 21]. Moreover, LF has also demonstrated anti-inflammatory effects in animal models by an inhibition of pro-Th1 cytokines and an increasing in regulatory cytokine IL-10 production [9, 11]. More specifically, LF exerts its anti-inflammatory effect during mouse atopic contact dermatitis (ACD) by reducing ear thickness and infiltration of inflammatory cells following a direct topical contact [11].

In addition, some Lactic Acid Bacteria (LAB) have shown immunomodulatory and anti-inflammatory activities. The genus *Lactobacillus* commonly used in many fermented dairy products [22] is the most studied of these probiotics [23]. The effects of LAB are very strain-dependent but many

lactobacilli act on Peyer's patches to stimulate IgA production, phagocytosis process and possess anti-inflammatory and anti-allergic activities by reducing the production of cytokines and immunoglobulin E (IgE) [24-27]. Cytokine production is also strain-dependent as some *lactobacilli* are able to increase Th1 profile while others increase Th2 profile [28]. These results suggest that *lactobacilli* could act both as immunostimulating and anti-inflammatory agents. Some studies also indicate that the effects of probiotics acting in synergy with food ingredients can be more intense than the probiotics alone [29]. Moreover, vitamins present in the MPM (niacin and riboflavin) as well as calcium also possess immunomodulatory effects [30-32].

Considering the positive effects on the immune system of both whey proteins and probiotic *lactobacilli*, a novel fermented whey protein-based ingredient, called Malleable Protein Matrix (MPM) [33], was tested for its immunomodulatory activities [34]. It was previously demonstrated that MPM stimulates production of blood polymorphonuclear cells, cytokine IL-18 as well as glutathione by white blood cells in healthy rat suggesting a stimulation of innate immunity [33, 34]. On the other hand, MPM can also reduce the production of important pro-inflammatory cytokines such as TNF α [33]. Moreover, it was shown *in vitro* that MPM reduces pro-inflammatory cytokines and inhibits the cytokines production following LPS stimulation on CaCo2 cells [33]. These results suggested that MPM might also exhibit anti-inflammatory properties when placed in the context of inflammation.

The objective of this present study was to evaluate the systemic anti-inflammatory potential of MPM and to determine how its complex composition may lead to synergistic effects. For this purpose, the oxazolone-induced atopic contact dermatitis mouse model (ACD) was used. This ACD mouse model requires two distinct phases [35]. First, the sensitization phase is initiated by topical application of oxazolone, which permits the activation of T cells through Langerhans cells acting as an antigen presenting cells. The elicitation phase is

next achieved by a subsequent topical application of oxazolone, which initiate the inflammatory process by recruiting activated T effector cells which in turn attract inflammatory cells [36-38]. The inflammatory cells recruited in this ACD model are principally macrophages, which attract neutrophils in the early inflammatory phase and monocytes as well as dendritic cells in the early and late inflammatory phases. CD4+ T cells act as regulatory cells and not as effector cells in the ACD model, in which they control the intensity of inflammatory reaction [39, 40]. A similar dermatitis model has recently been used to evaluate the anti-inflammatory activity of LF [11] and a milk-product fermented by *Lactobacillus casei* [27].

Methods

Reagents

The Malleable Protein Matrix (MPM) was obtained from Technologie Biolactis inc. (*LaBaie, Qc, Canada*). Briefly, the MPM is obtained by a protein specific recuperation procedure following the fermentation of sweet whey by a proprietary *Lactobacillus kefiranofaciens* strain (R2C2) isolated from kefir grains and adapted to grow in whey [33]. The composition of MPM is shown in Table 1. On a humid basis (w/w), the MPM contains 80% water, 8% protein, 6% minerals (2% calcium), 5% carbohydrate (2.7% lactose) and less than 1% of fat. Lyophilized MPM required reconstitution in water: 20 g of lyophilized MPM was blended with 80 mL of water for 2 minutes at maximum speed (20% w/v). The final reconstituted product is stable at 4°C for at least 1 month. Water-soluble hydrocortisone (HC) was obtained from Sigma-Aldrich Canada (*Oakville, On, Canada*) and was diluted in deionized double-distilled water to a final concentration of 10 mg/mL. For the mouse ACD model, the 4-ethoxy-methylene-2-phenyloxazol-5-one (oxazolone) (*Sigma-Aldrich Canada*) was required at a concentration of 5% (w/v) in acetone to cause inflammation.

Animals

CD-1 female mice were obtained from Charles River Laboratories (*St-Constant, Qc, Canada*) and were used at 20 days of age for studies in the mouse ACD model. The animals were housed in filter top isolator cages in a room kept at 20-23°C with humidity maintained between 35-45% with a 12-hour light-dark cycle and free access to a standard laboratory pelleted Rodent Lab Diet 5001 (*Ren's Feed & Supplies Limited, Oakville, On*). The experimental protocols used were approved by the Animal Care Committee of the INRS- Institut Armand-Frappier (Comité Institutionnel des Soins aux Animaux et de leur Utilisation (CISAU)) and were performed in accordance with the recommendations of the Canadian Council on Animal Care as specified in the Guide to the Care and Use of Experimental Animals (CISAU # 0306-01 and # 0410-01).

Mouse atopic contact dermatitis (ACD)

After a week adaptation in the animal facility, the mice were separated in groups of 10 animals. The grouping was randomized according to the weight of the rodents. The murine model of ACD was based on those firstly described by Garrigue *et al.* [41] and modified as follows: abdomen hair of CD-1 mice was removed and the sensitization phase was done by the application of 100 µL of oxazolone 5 % (w/v) in acetone on the hairless abdomen. After four days, the elicitation phase (first challenge) was initiated by the application of 50 µL of oxazolone 5% (w/v) in acetone on the right ear (25 µL each side of the ear). The second challenge was done 7 days after the first challenge with the same procedure. The ear thickness of the mice was measured every day with a digital caliper (*VWR, Mont-Royal, Canada*).

Dose-response curve

The dose-response curve has been done in the prophylactic anti-inflammatory mouse ACD model. Groups of 10 CD-1 mice received each day by gavages (per os (p.o)), 100 µL of reconstituted lyophilized MPM at three doses 20% (w/v), 10% (w/v) and 5% (w/v), 100 µL of water or 100 µL of water-soluble hydrocortisone

(10 mg/mL). The mouse ACD was performed as described previously and ear thickness was measured every day.

Prophylactic protocol - Mouse ACD

The prophylactic anti-inflammatory potential of MPM was evaluated by the administration of MPM seven days prior to sensitization. Groups of 10 CD-1 mice received each day by gavages (per os (p.o)), 100 μ L of reconstituted lyophilized MPM, 100 μ L of water or 100 μ L of water-soluble hydrocortisone (10 mg/mL). The mouse ACD was performed as described previously and ear thickness was measured every day. The mice's weight was measured twice a week. The spleen's weight was measured at the end of the protocol and was normalized in accordance to each mouse's weight.

Therapeutic protocol - Mouse ACD

The therapeutic anti-inflammatory potential of MPM was evaluated by the administration of MPM, soluble hydrocortisone or water as in the prophylactic protocol, but only after the first challenge. The other parameters were followed as described.

Evaluation of peripheral white blood cell counts

At the end of the prophylactic protocol of mouse ACD, the blood of each mouse was taken and white blood cell counts evaluated by flow cytometry. Briefly, the red blood cells were lysed with Optilyse C (*Beckman-Coulter, Fullerton*) in accordance with manufacturer's instructions. The cell counts were obtained by passage of 20 μ L of preparation in a Flow Cytometry Epics XL cytometer (*Beckman Coulter, Fullerton*). The lymphocytes, monocytes and polymorphonuclears (PMN) were separated in accordance with cell size and cell granulometry.

Evaluation of ears-myeloperoxidase (MPO) content

The method for the evaluation of MPO content was adapted from those developed by Bradley et al. [42] and Xia and Zweier [43]. The mice were sacrificed at the end of prophylactic protocol by CO₂ and the ears were immediately removed and frozen quickly in liquid nitrogen. The ears were chopped up and added in 50 mM phosphate potassium buffer, pH 6.0 supplemented with 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB). The ears were disrupted with three cycles of sonication (10 sec.) in water-ice bath followed by three freeze-thaw cycles in methanol-dry ice bath and another three cycles of sonication in water-ice bath. The homogenates were centrifuged at 10 000 g for 15 min at 4°C and the supernatants were conserved at -80°C until analyses. For the quantification of MPO content, 100 µL of homogenates (or MPO standard from *Sigma-Aldrich, Oakville, On*) were mixed with 2.9 mL of 50 mM phosphate potassium buffer containing 0.117 mg/mL of o-dianisidine (*Sigma-Aldrich, Oakville, On*) and 0.0005% hydrogen peroxide. The oxidation of o-dianisidine kinetic was followed at 460 nm with a spectrophotometer Varian Cary 300 (*Varian, St-Laurent, QC*) during 5 min at 25°C.

Statistical analysis

The inflammatory mouse ACD experiments were performed with groups counting 10 mice/group and two independent experiments. The statistical analysis of data was performed by the biostatistical service of INRS-Institut Armand-Frappier. Statistical analysis used was a repeated measure one-way ANOVA test that permits the comparison between groups during the entire experiment independently of each day. When the ANOVA test was not possible because of interactions between groups, a Student test was run for comparison of groups at each day.

Results

MPM is a whey-fermented product, which by its composition, has a high potential as an anti-inflammatory agent. The oxazolone-induced atopic contact dermatitis (ACD) model was used for the demonstration of MPM's effect on inflammatory diseases. Figure 1 shows an important reduction of ear thickness in mice consuming MPM as compared to that of the water control group. In the dose-response curve experiment, it is demonstrated that MPM possesses a higher anti-inflammatory effect when the concentration of product was 20% (Figure 1A). Consequently, MPM has been used for all experimentations at 20%. In the prophylactic protocol (Figure 1B), the maximal reduction of ear thickness was in the order of 26% in the MPM group and 35% in the hydrocortisone group as compared to the water control group. This thickness reduction was observed immediately after the first challenge and increases markedly after the second challenge. The ANOVA test indicates that reduction of ear thickness in the MPM group was statistically different of those from water group ($p < 0.07$) for the entire experiment. However, the ANOVA between MPM and HC groups was not possible because of interaction between the two groups. However, Student test has confirmed that the difference between both groups is not statistically different for the entire experiment (with exception for day 4). This statistical analysis permits to conclude that the anti-inflammatory effect of MPM is comparable to that of hydrocortisone treatment. In the therapeutic protocol (Figure 1C), the reduction of ear thickness was statistically different only after the second challenge in the MPM group compared to the water control group and reached a maximal reduction of 37%. For the group treated with hydrocortisone the maximal reduction of ear thickness reached 40%. Using the prophylactic protocol, these anti-inflammatory observations were confirmed in another independent experiment with the same batch of MPM and also with two other different batches of MPM. The results obtained were similar and statistically significant as confirmed by the ANOVA analysis, indicating the reproducibility of anti-inflammatory effect using different batches of MPM (data not shown).

The consumption of hydrocortisone is associated with a negative effect on mice growth which is clearly demonstrated by the cessation of growth in the mice who received hydrocortisone (Figure 2). The MPM demonstrated an absence of detrimental effect on growth in comparison to water control group. Moreover, the hydrocortisone treatment induced a spleen atrophy represented by a 50% reduction in spleen weight as compared to water or MPM consumption (Figure 3). This spleen atrophy indicates an immunosuppression of immune cells after hydrocortisone treatment. No statistical difference was observed between the water and MPM group on spleen weight suggesting no immunosuppression following MPM consumption. The cell counts confirmed this immunosuppression following hydrocortisone treatment as demonstrated by the important reduction (approximately 50%) in circulating lymphocytes in comparison to water control group (Figure 4). On the contrary, the MPM consumption showed a tendency to increase lymphocyte numbers. These results indicated that MPM consumption do not induce side effects generally associated with hydrocortisone treatment.

The polymorphonuclear (PMN) cell counts were higher in MPM and hydrocortisone fed groups compared to the water control group (Figure 4). The blood PMN counts were 1.86 and 2.35 fold higher in MPM and hydrocortisone respectively indicating a possible diminution of PMN extravasation in the ear of mice. The diminution of neutrophils extravasation as suggested by blood PMN counts was confirmed by the reduction of neutrophil content in ear of 62.4% and 82.6% following MPM and hydrocortisone treatment respectively, as measured by myeloperoxidase (MPO) ear analysis (Figure 5).

Discussion

MPM contains a variety of ingredients including whey proteins and peptides, LAB and their related exopolysaccharides, group B vitamins and calcium (Table 1). All these ingredients possess effects on the immune system such as an

interesting anti-inflammatory potential [5, 14, 15, 32, 44, 45]. In light of these components, the MPM is believed to possess an anti-inflammatory potential, which may be amplified by the synergy of its individual components. Previous observations suggested that the MPM could be an interesting treatment in inflammatory diseases. Indeed, it was demonstrated that MPM reduced production of cytokine TNF α in healthy rat [33]. This cytokine is very important in the development of the ACD disease and contributes in the amplification of inflammatory reaction [46]. The reduction of this pro-inflammatory cytokine following MPM consumption indicated its potential in the inhibition of development of inflammatory disease and reduction of its intensity. Moreover, MPM inhibited the production of cytokines *in vitro* on CaCo2 cells stimulated with LPS [33] suggesting the inhibition of development of inflammation following an inflammatory stimulus.

The anti-inflammatory potential of MPM has been confirmed in these studies with the murine ACD model. This model of inflammation has proven to be a sensitive and useful tool to determine efficacy and potency of several anti-inflammatory and immunosuppressive drugs used in dermatological disorders such as dermatitis and psoriasis. Glucocorticoids, such as hydrocortisone, are commonly used to relieve skin and joint inflammation and have been used as a positive control group in these experiments [35]. This model comprises two important phases in order to examine inflammation: 1) Sensitization phase that is developed by application of oxazolone on the abdomen, allowing the recruitment of antigen presenting cells, which capture and present the antigen (oxazolone) to naive T lymphocytes that afterwards become active. 2) Elicitation phase developed by the application of oxazolone on the ear, which allows activation of T lymphocytes to move to the ear and recruit inflammatory cells [35, 47].

MPM and hydrocortisone administered *p.o.* either in a prophylactic (Figure 1B) or a therapeutic fashion (Figure 1C) reduced the inflammation with similar efficiency as demonstrated by the reduction of ear redness and thickness. In the

prophylactic protocol (Figure 1B), the reduction of ear inflammation was observed as soon as one day after the first challenge and this protective effect was conserved throughout the entire course of the experiment. On the other hand, for therapeutic protocol, the anti-inflammatory effect following MPM consumption was apparent only after the second challenge (Figure 1C). The effect of MPM in this model (therapeutic protocol) showed that a certain period of time is required to overcome existing inflammation. This indicates that the MPM possesses an anti-inflammatory effect in an existing disease and is not only a preventive treatment. This therapeutic effect is interesting because those who suffer from such disease can consume MPM during crisis and will benefit of its effect. This study has shown that the reduction of inflammation by MPM consumption is not negligible as demonstrated by the comparison with hydrocortisone treatment. From that observation, we could speculate that the MPM might also exerts a beneficial effect on the reduction of skin itching and pain.

The MPM has a strong anti-inflammatory effect as demonstrated by its ability to reduce dermatological inflammation to the same extent than that of hydrocortisone. However in contrast to hydrocortisone, the MPM showed no side effects generally associated to medication including spleen atrophy, reduction in lymphocyte circulating cells or deleterious effect on body weight gain (Figures 2, 3 and 4). Hydrocortisone exerts its anti-inflammatory potential by suppression of immune cells. The reduction of inflammation observed by hydrocortisone treatment corresponded to a suppression of total immune cells (not only those implicated in inflammation), which was seen by the reduction in blood lymphocytes (Figure 4) and in spleen weight (Figure 3) for the mice consuming hydrocortisone. Consequently, people treated by hydrocortisone will be in a general immunosuppressed state and are therefore, more susceptible to contract other diseases and infection. No reduction in immune cells or spleen atrophy was observed in the mice who consumed MPM in comparison with the control water group. In fact, a trend showing immune stimulation by the MPM consumption

was observed as indicated by the tendency to increase lymphocytes counts as well as spleen weight.

Atopic dermatitis is a disease that affects young children consequently, the use of hydrocortisone would not be advisable because of its inhibitory properties on growth [48]. This inhibition in growth following hydrocortisone consumption has been demonstrated in this study where the growth of these young mice treated with hydrocortisone was stopped during all the experiment (Figure 2) in comparison with mice treated with MPM and water which gained weight. Consequently, consumption of MPM by children and young adult in replacement of hydrocortisone as an anti-inflammatory product would be a good alternative.

The absence of all these detrimental effects by MPM consumption suggests that the mechanism of its anti-inflammatory action is different than that of hydrocortisone. However, both hydrocortisone and MPM seem to inhibit neutrophil extravasation and accumulation in inflamed tissues as shown with a higher polymorphonuclear cells (PMN) in circulation as well as a reduced MPO content in ear (Figures 4 and 5). Results in figure 4 demonstrate an inverse correlation between inflammation and PMN counts where in the hydrocortisone and MPM groups, the blood PMN counts is higher while the ear thickness is lower than reference water group. These results are consistent with those observed for ear MPO content (Figure 5). The MPO is an enzyme exclusively present in neutrophil granules and its enzymatic activity measured in a tissue is in direct correlation of the levels of neutrophils in a tissue [42]. The MPO results showed that the neutrophil infiltration in ear of mice that received hydrocortisone and MPM is reduced compared to the mice receiving water. The blood PMN count parameter and ear MPO content could be explained by the fact that in ACD, the neutrophils (the most important group in PMN) move from blood to ear because these cells are principally responsible for inflammation [36-38]. The hydrocortisone as well as the MPM seems to prevent the neutrophil extravasation from blood to ear, reducing the ear inflammation. However, the mechanism

causing this inhibition of neutrophil extravasation is different between these two groups because of the absence of immunosuppression in MPM group as seen by the absence of spleen atrophy as well as blood lymphocyte counts (Figures 3 and 4). This inhibition of neutrophil infiltration indicate that MPM will be a good candidate for the treatment or prevention of neutrophilic diseases such as, Sweet syndrome (a neutrophilic dermatose resulting of Crohn's disease complications) as well as chronic obstructive pulmonary disease [49, 50].

It is previously demonstrated that MPM enhances some cytokines, blood PMN cells and glutathione production by leukocytes [33] indicating that MPM exerts a definitive immunomodulation. Its consumption could either be beneficial in a context of stimulation of innate immunity but detrimental in the context of inflammatory disease. This present study reveals the interesting properties of MPM in the reduction of inflammation confirming that despite its innate immunity stimulation potential, MPM act also as an anti-inflammatory agent. The complexity of MPM components as well as the potential synergy between its components could explain the properties of MPM to be an immunomodulatory agent as well as to be an anti-inflammatory agent in the context of inflammation. These two different immune situations suggest that MPM act trough a regulatory mechanism explaining their both immunomodulatory and anti-inflammatory properties. These results demonstrate that, as a new product, the Malleable Protein Matrix reduces inflammation and immune dysfunctions when consumed orally while maintaining an appropriate immune system threshold. Experiments to demonstrate the mechanism of action responsible for the anti-inflammatory effect of the MPM consumption and other parameters to determine how specific cells are implicated and influenced by MPM consumption in this ACD model are underway.

Conclusion

MPM possesses a strong anti-inflammatory effect comparable to hydrocortisone when examined in the ACD model. The anti-inflammatory effects of consumption of MPM occur without the undesirable side effects normally associated with hydrocortisone. Therefore, MPM would be an alternative of choice for children and young adult suffering from chronic inflammatory of various diseases such as ACD. The consumption of the MPM could act as a preventive or a therapeutic nutraceutical in the case of inflammatory diseases like atopic dermatitis or related diseases such as, psoriasis. Psoriasis is a chronic inflammatory disease with similar effects on the immune system to that observed for ACD.

Competing Interests

Technologie Biolactis (TB) was the industrial sponsor of a Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant obtained by INRS (CD). Collaborative research conventions and agreements intervened between TB, INRS and NSERC. INRS is a minor shareholder of TB (less than 1%) and does not have any vote. The findings of the present study are covered by a patent application (PCT CA2002/001899). JB was an on-site scholar of Fond de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and part of the scholarship was covered by TB.

Authors' contributions

JB design the animal studies, carried out the animal and other experiments, perform the statistical analysis and drafted the manuscript. CD participated in the design of animal studies, data interpretation and the statistical analysis. CD revised the manuscript for the intellectual content and language. PL participated in the design of animal studies, data interpretation and revised the manuscript for the intellectual content and language. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors wish to thank M. Roger Dubuc for the help in adaptation of the MPO enzymatic assay and Lilianne Gueerts for the help in animal studies. We also thank Drs Alain Lamarre and Denis Girard for the intellectual help in animal design as well as results interpretation. Jean-François Lapointe revised the manuscript for the intellectual content and language and participated in data interpretation. Marie Désy has done the statistical analysis in INRS-IAF biostatistical service. This study was funded by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Strategic Grant STP 246405-1. JB was a Ph.D. scholar of « Fond de recherche en santé du Québec (FRSQ) »

Table 1. Composition of MPM

<i>Composition (g/100 g)</i>	
Humidity	81.4
Protein	8.1
Lipids	0.9
Ash (minerals)	5.1
Carbohydrates	4.6
Lactose	2.7
Galactose	0.2
<i>Minerals (mg/100g)</i>	
Potassium	142.9
Sodium	175.2
Calcium	1600
Phosphorus	730.3
Selenium	< 0.1
Magnesium	5.4
<i>Oligo-elements (mg/100g)</i>	
Copper	0.07
iron	0.24
Manganese	0.05
Zinc	0.13
<i>Vitamins (mg or µg/100g)</i>	
Riboflavine (B2)	0.32 mg
Niacin (B3)	1.00 mg
Pyridoxine (B6)	0.04 mg
Cobalamine (B12)	Not detected
Ascorbic acid (C)	Not detected
Folic acid	5 µg
<i>Bacterial count (CFU/100g)</i>	
LAB	6X10 ¹¹

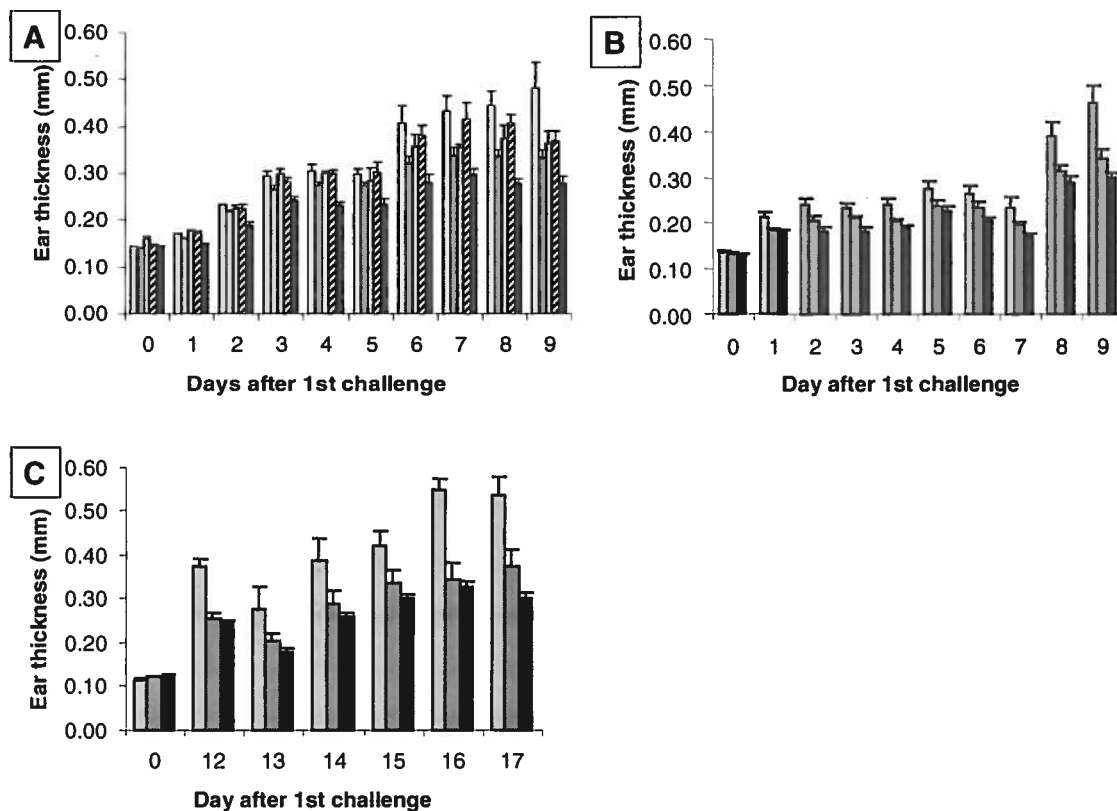


Figure 1. Ear thickness of mice administered p.o. with the MPM, hydrocortisone or water. Fig 1A. Dose-response curve during the prophylactic model : Administrations started 7 days prior sensitization and challenges with oxazolone ($p < 0.07$ for MPM 20% and hydrocortisone groups compared with water reference group in the ANOVA statistical analysis). Legend: Light-grey bars: Water, Dark-grey bars: MPM 20%, White bars: MPM 10%, Hashed bars: MPM 5%, Black bars: Hydrocortisone. Fig 1B. Prophylactic model: Administrations started 7 days prior sensitization and challenges with oxazolone ($p < 0.07$ for MPM and hydrocortisone groups compared with water reference group in the ANOVA statistical analysis) Legend: Light-grey bars: Water, Dark-grey bars: MPM, Black bars: Hydrocortisone. Fig 1C. Therapeutic model: Administrations started after sensitization but during oxazolone challenges ($p < 0.05$ for MPM and hydrocortisone groups compared to water reference group in the ANOVA statistical analysis from day 8 until the end of experiment). Legend: Light-grey bars: Water, Dark-grey bars: MPM, Black bars: Hydrocortisone. (n=10)

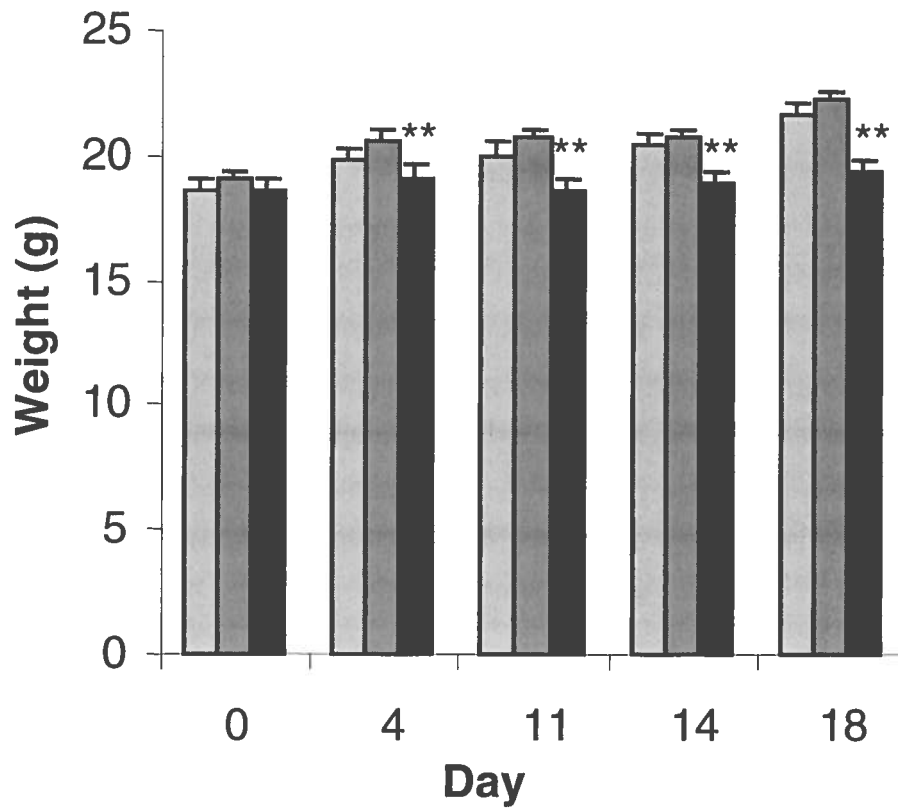


Figure 2. Mice weight during the prophylactic ACD model.

Legend: Light-grey bars: Water, Dark-grey bars: MPM, Black bars: Hydrocortisone. (* p < 0.05) (n=10)

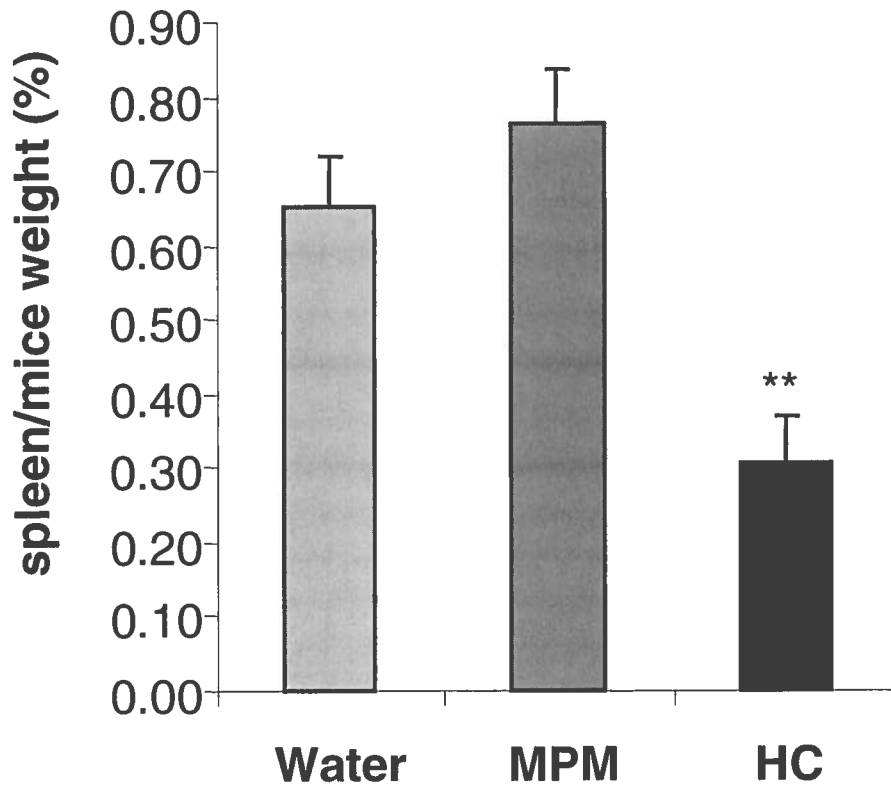


Figure 3. Mice spleen weight at the sacrifice in the prophylactic ACD model.

Legend: Light-grey bars: Water, Dark-grey bars: MPM, Black bars: Hydrocortisone. (** $p < 0.01$) (n=10)

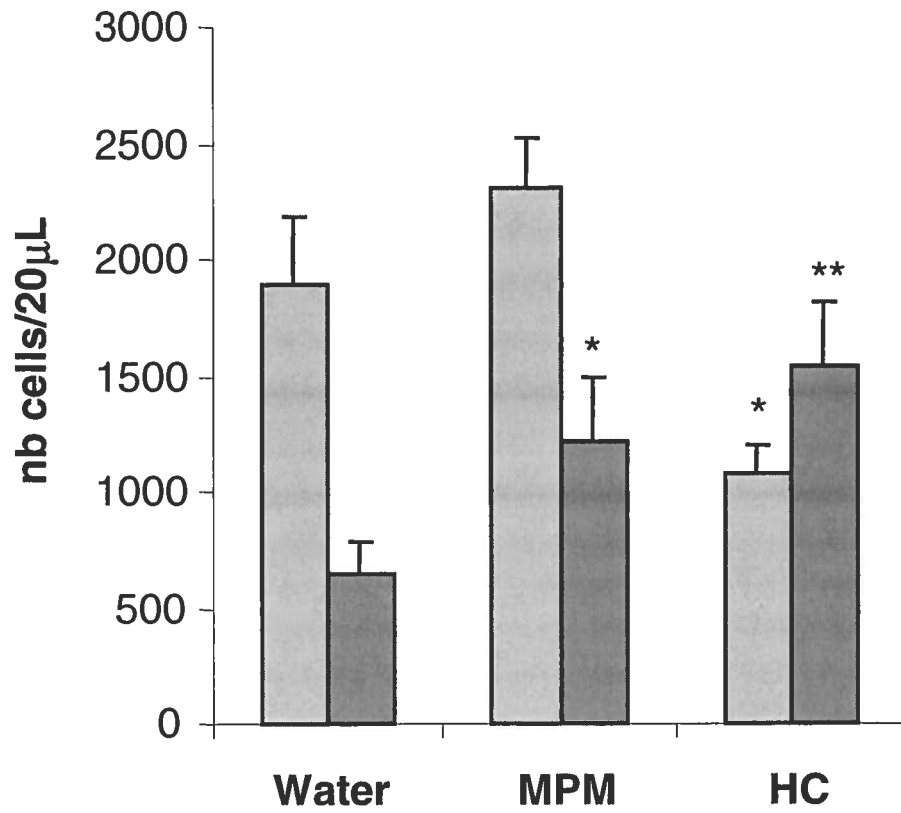


Figure 4. Circulating cell counts 17 days after the first oxazolone challenge in the prophylactic ACD model.

Legend: Light-grey bars: Lymphocyte counts, Dark-grey bars: PMN counts

(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) (n=10)

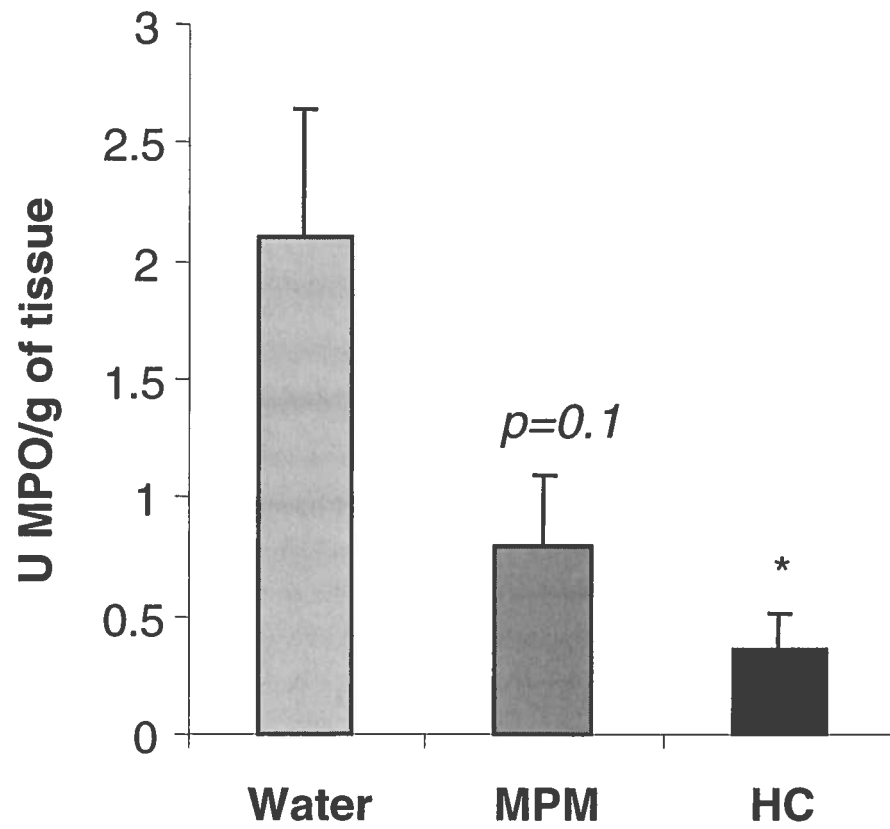


Figure 5. Myeloperoxidase (MPO) contents in ears 18 days after the first oxazolone challenge during the prophylactic ACD model.

(* $p < 0.05$) (n=10)

References

1. Oeser A, Chung CP, Asanuma Y, Avalos I, Stein CM: **Obesity is an independent contributor to functional capacity and inflammation in systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**:3651-3659.
2. Toker S, Shirom A, Shapira I, Berliner S, Melamed S: **The association between burnout, depression, anxiety, and inflammation biomarkers: C-reactive protein and fibrinogen in men and women.** *J Occup Health Psychol* 2005, **10**:344-362.
3. Bruunsgaard H: **Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation.** *J Leukoc Biol* 2005, **78**:819-835.
4. Calder PC, Kew S: **The immune system: a target for functional foods?** *British Journal of Nutrition* 2002, **88**:S165-S176.
5. Beaulieu J, Dupont C, Lemieux P: **Whey proteins and peptides: beneficial effects on immune health.** *Therapy* 2006, **3**:1-10.
6. Laiho K, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E: **Inventing probiotic functional foods for patients with allergic disease.** *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002, **89**:75-82.
7. Bounous G, Gold P: **The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione.** *Clin Invest Med* 1991, **14**:296-309.
8. Kent KD, Harper WJ, Bomser JA: **Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cells.** *Toxicol In Vitro* 2003, **17**:27-33.
9. Ward PP, Uribe-Luna S, Conneely OM: **Lactoferrin and host defense.** *Biochem Cell Biol* 2002, **80**:95-102.
10. Kano H, Mogami O, Uchida M: **Oral administration of milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1037R-1 to DBA/1 mice inhibits secretion of proinflammatory cytokines.** *Cytotechnology* 2002, **40**:67-73.
11. Kimber I, Cumberbatch M, Dearman RJ, Headon DR, Bhushan M, Griffiths CE: **Lactoferrin: influences on Langerhans cells, epidermal cytokines, and cutaneous inflammation.** *Biochem Cell Biol* 2002, **80**:103-107.

12. Cross ML, Gill HS: **Modulation of immune function by a modified bovine whey protein concentrate.** *Immunol Cell Biol* 1999, **77**:345-350.
13. Miyauchi H, Hashimoto S, Nakajima M, Shinoda I, Fukuwatari Y, Hayasawa H: **Bovine lactoferrin stimulates the phagocytic activity of human neutrophils: identification of its active domain.** *Cell Immunol* 1998, **187**:34-37.
14. Migliore-Samour D, Roch-Arveiller M, Tissot M, Jaziri M, Keddad K, Giroud JP, Jolles P: **Effects of tripeptides derived from milk proteins on polymorphonuclear oxidative and phosphoinositide metabolisms.** *Biochem Pharmacol* 1992, **44**:673-680.
15. Brix S, Bovetto L, Fritsche R, Barkholt V, Frokiaer H: **Immunostimulatory potential of beta-lactoglobulin preparations: Effects caused by endotoxin contamination.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003, **112**:1216-1222.
16. Wong CW, Watson DL: **Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice.** *J Dairy Res* 1995, **62**:359-368.
17. Gill HS, Doull F, Rutherford KJ, Cross ML: **Immunoregulatory peptides in bovine milk.** *Br J Nutr* 2000, **84 Suppl 1**:S111-117.
18. Bounous G, Kongshavn PA: **Differential effect of dietary protein type on the B-cell and T-cell immune responses in mice.** *J Nutr* 1985, **115**:1403-1408.
19. Hakansson A, Andreasson J, Zhivotovsky B, Karpman D, Orrenius S, Svanborg C: **Multimeric alpha-lactalbumin from human milk induces apoptosis through a direct effect on cell nuclei.** *Exp Cell Res* 1999, **246**:451-460.
20. Matar C, Valdez JC, Medina M, Rachid M, Perdigon G: **Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant.** *J Dairy Res* 2001, **68**:601-609.
21. Clare DA, Catignani GL, Swaisgood HE: **Biodefense properties of milk: The role of antimicrobial proteins and peptides.** *Current Pharmaceutical Design* 2003, **9**:1239-1255.
22. Stiles ME, Holzapfel WH: **Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy.** *International Journal of Food Microbiology* 1997, **36**:1-29.

23. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E: **Probiotics: an overview of beneficial effects.** *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002, **82**:279-289.
24. Clancy R: **Immunobiotics and the probiotic evolution.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2003, **38**:9-12.
25. Erickson KL, Hubbard NE: **Probiotic immunomodulation in health and disease.** *J Nutr* 2000, **130**:403S-409S.
26. Kitazawa H, Watanabe H, Shimosato T, Kawai Y, Itoh T, Saito T: **Immunostimulatory oligonucleotide, CpG-like motif exists in *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* NIAI B6.** *Int J Food Microbiol* 2003, **85**:11-21.
27. Chapat L, Chemin K, Dubois B, Bourdet-Sicard R, Kaiserlian D: ***Lactobacillus casei* reduces CD8+ T cell-mediated skin inflammation.** *Eur J Immunol* 2004, **34**:2520-2528.
28. Cross ML, Mortensen RR, Kudsk J, Gill HS: **Dietary intake of *Lactobacillus rhamnosus* HNOO1 enhances production of both Th1 and Th2 cytokines in antigen-primed mice.** *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2002, **191**:49-53.
29. Kopp-Hoolohan L: **Prophylactic and therapeutics uses of probiotics : a review.** *Journal of american diet association* 2001, **101**:229-238.
30. Reddy S, Young M, Ginn S: **Immunoexpression of interleukin-1beta in pancreatic islets of NOD mice during cyclophosphamide-accelerated diabetes: co-localization in macrophages and endocrine cells and its attenuation with oral nicotinamide.** *Histochem J* 2001, **33**:317-327.
31. Grimble RF: **Effect of antioxidative vitamins on immune function with clinical applications.** *Int J Vitam Nutr Res* 1997, **67**:312-320.
32. Meydani SN, Ha WK: **Immunologic effects of yogurt.** *Am J Clin Nutr* 2000, **71**:861-872.
33. Simard E, Pilote D, Dupont C, Lajoie N, Quet M, Lemieux P, Goyette P: **Malleable protein matrix and uses thereof.** *United States Patent #60/341* 2001.
34. Beaulieu J, Dubuc R, Beaudet N, Lapointe J-F, Dupont C, Lemieux P: **Immunomodulatory potential of a malleable matrix composed of fermented whey proteins and lactic acid bacteria.** *J Med Food* 2007, in press.

35. Grabbe S, Schwarz T: **Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity.** *Immunol Today* 1998, **19**:37-44.
36. Romani N, Schuler G: **The immunologic properties of epidermal Langerhans cells as a part of the dendritic cell system.** *Springer Semin Immunopathol* 1992, **13**:265-279.
37. Steinman RM, Witmer-Pack M, Inaba K: **Dendritic cells: antigen presentation, accessory function and clinical relevance.** *Adv Exp Med Biol* 1993, **329**:1-9.
38. Bos JD, Kapsenberg ML: **The skin immune system: progress in cutaneous biology.** *Immunol Today* 1993, **14**:75-78.
39. Desvignes C, Etchart N, Kehren J, Akiba I, Nicolas JF, Kaiserlian D: **Oral administration of hapten inhibits in vivo induction of specific cytotoxic CD8+ T cells mediating tissue inflammation: a role for regulatory CD4+ T cells.** *J Immunol* 2000, **164**:2515-2522.
40. Dubois B, Chapat L, Goubier A, Papiernik M, Nicolas JF, Kaiserlian D: **Innate CD4+CD25+ regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8+ T cells mediating skin inflammation.** *Blood* 2003, **102**:3295-3301.
41. Garrigue JL, Nicolas JF, Fragnals R, Benezra C, Bour H, Schmitt D: **Optimization of the mouse ear swelling test for in vivo and in vitro studies of weak contact sensitizers.** *Contact Dermatitis* 1994, **30**:231-237.
42. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G: **Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker.** *J Invest Dermatol* 1982, **78**:206-209.
43. Xia Y, Zweier JL: **Measurement of myeloperoxidase in leukocyte-containing tissues.** *Anal Biochem* 1997, **245**:93-96.
44. Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Saag KG: **Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**:72-77.

45. Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P: **An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria.** *International Dairy journal* 2002, **12**:163-171.
46. Xu H, Bjarnason B, Elmets CA: **Sensitization versus elicitation in allergic contact dermatitis: potential differences at cellular and molecular levels.** *Am J Contact Dermat* 2000, **11**:228-234.
47. Cavey D, Bouclier M, Burg G, Delamadeleine F, Hensby CN: **The pharmacological modulation of delayed type hypersensitivity (DTH) reactions to topical oxazolone in mouse skin.** *Agents Actions* 1990, **29**:65-67.
48. Kalant H, Roschlau WHE: **Adrenocorticotrophic hormone and adrenal steroids.** In *Principles of medical pharmacology*. Edited by Decker BC. Toronto; 1989: 474-482
49. Callen JP: **Neutrophilic dermatoses.** *Dermatol Clin* 2002, **20**:409-419.
50. O'Donnell R, Breen D, Wilson S, Djukanovic R: **Inflammatory cells in the airways in COPD.** *Thorax* 2006, **61**:448-454.

CHAPITRE 6. ARTICLE IV

6.1 Mise en contexte

Les effets anti-inflammatoires de la MPM ont été démontrés *in vivo* dans le modèle de la dermatite de contact. Il a été identifié que l'effet anti-inflammatoire de la MPM est comparable à celui de l'hydrocortisone malgré l'absence des effets secondaires généralement associés à la consommation d'hydrocortisone orale suggérant un mécanisme d'action différent. Les résultats semblent indiquer que le mécanisme d'action associé à l'effet anti-inflammatoire de la MPM serait relié à une diminution de l'extravasation des neutrophiles.

Le modèle de la poche d'air possède comme caractéristique principale, de permettre un recrutement extrême de neutrophiles suite à l'injection d'un stimulus. Le but de cette présente étude était d'évaluer les effets anti-inflammatoires de la MPM précisément sur le processus d'extravasation des neutrophiles et sur les activités de ces neutrophiles recrutés dans la poche d'air.

Les objectifs de cette étude étaient :

- i) Évaluer le potentiel anti-inflammatoire de la MPM spécifiquement lors de l'extravasation des neutrophiles.
- ii) Vérifier l'état d'activation des neutrophiles recrutés principalement quant à leur potentiel de phagocytose.
- iii) Évaluer la production de diverses cytokines et chimiokines.
- iv) Caractériser le mécanisme d'action de la MPM.

6.2 Contribution des auteurs

Le Dr. Denis Girard ainsi que les membres de son équipe de recherche m'ont appris les techniques de manipulations animales spécifiques au modèle de la poche d'air. Ils m'ont également supervisé dans l'adaptation du modèle aux conditions particulières associées à mon étude. J'ai effectuée toutes les expériences chez les animaux; c'est-à-dire autant l'adaptation du modèle ainsi que toutes les manipulations animales. J'ai aussi rédigé l'article ainsi que toutes corrections nécessaires à la rédaction de l'article. Les Dr. Denis Girard, Claude Dupont et Pierre Lemieux m'ont dirigé dans la planification des expériences et dans la correction de l'article.

6.3 Résumé français

Inhibition of neutrophil infiltration by a malleable protein matrix of lactic acid bacteria-fermented whey proteins *in vivo*.

Josée Beaulieu^{1,2}, Denis Girard³, Claude Dupont¹ and Pierre Lemieux^{2*}.

1. Institut national de la recherche scientifique, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7.
2. Technologie Biolactis, 500 boul. Cartier suite 218, Laval, Québec, Canada, H7V 5B7.
3. Institut national de la recherche scientifique, INRS-Institut Armand Frappier, 245 boul. Hymus, Pointe-Claire, Québec, Canada, H9R 1G6.

Objectif: Un nouvel ingrédient nutraceutique, la Matrice Protéique Malleable (MPM), a précédemment démontré un effet anti-inflammatoire positif et significatif comparable à celui d'un médicament conventionnel lors d'une maladie inflammatoire systémique. L'objectif de cette présente étude est de caractériser cet effet anti-inflammatoire sur l'infiltration des neutrophiles, leur activité phagocytante et la production de cytokines et chimiokines.

Méthodes: Pour atteindre cet objectif, des groupes de dix souris C57BL/6J de 6-8 semaines ont reçu, *per os*, de l'eau ou des MPM durant 2 semaines dans le modèle de la poche d'air. Le recrutement de neutrophiles et leurs activités ont été mesurées suivant l'injection de lipopolysaccharides (LPS) dans la poche d'air.

Résultats: Le nombre de cellules recrutées dans le groupe contrôle ayant été traité à l'eau est approximativement de 18×10^6 cellules/poche et est réduit à approximativement 9×10^6 cellules/poche suite à la consommation de MPM représentant une inhibition de 50% des leucocytes infiltrés. Une réduction considérable de la production de cytokines et de chimiokines principalement des cytokines TNF α , IL-1 β et IL-6, est aussi démontrée suggérant une inhibition de la production des médiateurs responsables de l'extravasation des leucocytes. En

contre partie, la MPM n'a eu aucun effet sur l'activité phagocytante des neutrophiles.

Conclusion: L'administration des MPM démontre une réduction significative de l'infiltration des neutrophiles associée avec une inhibition de la production de cytokines et chimiokines. L'inhibition de 50% de l'infiltration des neutrophiles dans le modèle de la poche d'air indique que la MPM est un bon candidat dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde et les maladies neutrophiliques comme le suggère ce modèle qui possède, *in vivo*, les mêmes caractéristiques que ces pathologies.

Article accepté pour publication dans : *Inflammation Research*, juin 2007.

Reproduit avec la permission de *Inflammation Research* et Birkhäuser Publication

6.4 Inhibition of neutrophil infiltration by a malleable protein matrix of lactic acid bacteria-fermented whey proteins *in vivo*

Josée Beaulieu^{1,2}, Denis Girard³, Claude Dupont¹ and Pierre Lemieux^{2*}.

1. Institut national de la recherche scientifique, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7.
2. Technologie Biolactis, 500 boul. Cartier suite 218, Laval, Québec, Canada, H7V 5B7.
3. Institut national de la recherche scientifique, INRS-Institut Armand Frappier, 245 boul. Hymus, Pointe-Claire, Québec, Canada, H9R 1G6.

* Corresponding author: Pierre Lemieux, Ph.D

e-mail addresses:

JB: josee.beaulieu@iaf.inrs.ca

DG : denis.girard@iaf.inrs.ca

CD: claudedupont@iaf.inrs.ca

PL: plemieux@biolactis.com

KEYWORDS: AIR POUCH, CYTOKINES, INFLAMMATION, NEUTROPHIL, WHEY

Running Title: Inhibition of neutrophil infiltration by MPM

ABSTRACT

Objective: A novel nutraceutical ingredient, the Malleable Protein Matrix (MPM), has previously demonstrated a significant anti-inflammatory effect in a systemic inflammatory disease model, comparable to conventional drugs. The objective of this study was to investigate the potential anti-inflammatory effects of MPM on neutrophil infiltration *in vivo*, phagocytosis activity as well as cytokine and chemokine production.

Methods: Groups of ten C57BL/6J mice received water or MPM *per os* for a period of 2 weeks prior to the creation of a murine air pouch. The subsequent neutrophil recruitment and activities were characterized following lipopolysaccharide injection.

Results: In the water control group, the number of recruited cells was 1.8×10^7 cells/pouch, which was reduced to 9×10^6 cells/pouch with oral MPM consumption, representing an inhibition of 50% of infiltrating leukocytes. A considerable reduction in the cytokine and chemokine production, mostly TNF α , IL-1 β and IL-6 production in the MPM-treated group, suggested an inhibition of the mediators responsible of leukocyte extravasation. On the other hand, MPM consumption had no effect on neutrophil phagocytosis activity.

Conclusion: MPM administration demonstrates a significant reduction of neutrophil infiltration associated with an inhibition of cytokine and chemokine production. The air pouch model shares similarities with *in vivo* characteristics of rheumatoid arthritis and neutrophilic diseases, both of which would benefit from this 50% inhibition of neutrophil infiltration induced by MPM.

INTRODUCTION

Neutrophils are one of the most important cells implicated in inflammatory diseases; being the most abundant leukocytes in the blood and the first cells recruited to inflammatory sites [1]. These cells are responsible for amplifying inflammation by the production of cytokines and additional mediators, which attract distinct leukocytes such as macrophages [2]. Neutrophils exhibit many activities including phagocytosis, cytokine, chemokine and free radical production as well as the release of cytotoxic compounds [2]. All of these activities are essential in host defense against invading pathogens but can become deleterious in cases of inappropriate activation, such as autoimmune and inflammatory diseases [2].

It is speculated that modern life-style, which is associated with obesity, stress and inactivity, is one of the major cause of immunological diseases, particularly those associated with chronic inflammation [3-5]. Studies have demonstrated that nutraceutical ingredients can counteract this life-style impact and maintain an immune balance [6]. These products have a regulatory role on neutrophil functions including an antioxidant potential as seen by reduction of free radical production by neutrophils [7], inhibition of neutrophil infiltration by reducing adhesion molecule levels in circulation [8], regulation of cytokine and chemokine secretion [9, 10] and regulation of the phagocytosis activity [11].

One of the most important class of nutraceutical foods is the milk- and whey-derived products, known for their beneficial effects such as immune modulation and anti-inflammatory properties [12]. Whey proteins such as β -lactoglobulin, α -lactalbumin, bovine serum albumin and lactoferrin have shown many effects on inflammatory cells [12]. In immunocompetent individuals, a stimulation of innate immunity is demonstrated by amplified phagocytosis activities [13-17], pro-inflammatory cytokines production [15, 16, 18], oxidative burst [13, 19] and in increased adherence of cells to the epithelia [13]. The same

proteins also have anti-inflammatory potential in inflammatory diseases, including a reduction of pro-inflammatory cytokines in inflammatory models [18, 20-23] and additional markers of inflammation such as ear thickness in a dermatitis model [22, 24, 25] as well as increasing regulatory cytokines [21]. These proteins also exhibit a suppressive role in cell proliferation upon stimulation by mitogens [26-28]. The probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) is another important nutraceutical ingredient that shows a myriad of activities on immunity. The genus *Lactobacillus* is one of the most studied probiotics that shows anti-inflammatory potential both *in vitro* and *in vivo* [29-32].

Considering the anti-inflammatory activities of both whey proteins and probiotic *lactobacilli*, a novel fermented whey protein-based ingredient, called Malleable Protein Matrix (MPM), is expected to have excellent properties. Previous studies revealed that MPM exerted anti-inflammatory activity *in vivo*, as shown by reduction of ear thickness with the atopic contact dermatitis (ACD) model [33]. This anti-inflammatory activity is related to the inhibition of neutrophil extravasation in ear, as demonstrated by the higher circulating polymorphonuclear cell counts and the lower myeloperoxidase activity (associated to neutrophil content) in ear. In regard of these results, it is conceivable that MPM could be interesting as a natural treatment to prevent the development of neutrophilic diseases.

The air pouch model was developed by Selye in 1953 [34] to determine the effect of specific drugs on neutrophilic diseases. The murine air pouch is characterized by the formation of a structure composed of fibroblasts (50-90%) and macrophages (10-50%), which is considered equivalent to an *in vivo* culture system for synovial membrane inflammation, as what is observed in rheumatoid arthritis [35]. Administration of different agents into the air pouch is known to activate the fibroblasts and macrophages, which leads to production of cytokines and chemokines provoking leukocyte attraction [35]. In particular, injection of

LPS is known to attract several millions of leukocytes into the air pouch, of which more than 80% of cells are typically neutrophils [36, 37].

We selected the air pouch model to explore and confirm the inhibition by MPM of neutrophil infiltration in tissue and to characterize the effect on neutrophil activities. The injection of LPS into the air pouch following water or MPM administration demonstrates a significant reduction of neutrophil infiltration by MPM and this reduction is associated with an inhibition of pro-inflammatory cytokine and chemokine production.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

The Malleable Protein Matrix (MPM) was obtained from Technologie Biolactis *inc.* (LaBaie, QC, Canada). A protein specific recuperation procedure following the fermentation of sweet whey by a proprietary probiotic strain (*Lactobacillus kefiranofaciens subsp.* R2C2 isolated from kefir grains and adapted to grow in whey [30]) allows the isolation of the MPM. The MPM (wt/wt), contains 80% water, 8% protein, 6% minerals (2% calcium), 5% carbohydrate (2.7% lactose) and less than 1% of fat. Lyophilized MPM required reconstitution in water: 20 g of lyophilized MPM was blended with 80 mL of water for 2 minutes at maximum speed. The final reconstituted product was stable at 4°C for at least 1 month. Lipopolysaccharides (LPS) from *Escherichia coli* (Sigma Aldrich, Oakville, Canada) were used at one µg/mL in the air pouch model to cause inflammation.

ANIMALS

C57BL/6J female mice were obtained from Charles River Laboratories (*St-Constant, QC, Canada*) and were used at 6-8 weeks of age. The animals were housed in filter top isolator cages in a room kept at 20-23°C with humidity

maintained between 35-45% with a 12-hour light-dark cycle and free access to a standard laboratory pelleted Rodent Lab Diet 5001 (*Ren's Feed & Supplies Limited, Oakville, ON*). The experimental protocols used were approved by the Animal Care Committee of the INRS-Institut Armand-Frappier (Comité institutionnel des soins aux animaux et de leur utilisation (CISAU)) and were performed in accordance with the recommendations of the Canadian Council on Animal Care as specified in the Guide to the Care and Use of Experimental Animals.

Air Pouch Model

Groups of ten C57BL/6J mice received 100 μ L of reconstituted MPM or 100 μ L of water each day during 14 days by gavages (*per os (p.o)*). At days 8 and 11, mice were anesthetized with isoflurane and 3.0 cc of sterile air passed through a 0.22 μ m filter mounted on syringe was injected subcutaneously with a 26-gauge needle in the back of mice to create the air pouch. At day 14, 1 mL of LPS (1 μ g/mL) or its diluent (PBS) (*Sigma Aldrich*) was injected into the air pouch. Two control groups of ten C57BL/6J mice received no treatment before LPS (or PBS) injection. After an incubation period of 6 hours, the infiltrated cells were washed once with 1 mL and then twice with 2 mL of HBSS (Hank's balanced salt solution) (*Sigma Aldrich*)-10 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (*Sigma Aldrich*). The supernatant of the first wash was conserved for the detection of cytokines and chemokines. The cells were pooled, washed twice in PBS and counted with optical microscopy (*Leitz Wetzlar Microscope*).

Phagocytic activity of polymorphonuclear cells in the air pouch model

The concentration of cell exudate of the air pouch model was adjusted at 2×10^6 cells/mL in RPMI 1640 medium (*Sigma Aldrich*) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (*Invitrogen, Burlington, Canada*). An aliquot of 5 μ l of DQ-BSA Green (1 mg/mL) (*Invitrogen*) was added to 100 μ L of cells and incubated at 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ for 30 minutes. A negative control was incubated at 4 $^{\circ}$ C to evaluate the non-specific reaction. After 3 washes, the cells were suspended in

500 μ L PBS and analyzed in FL1-log in a Flow Cytometer Epics XL (*Beckman Coulter Canada, Mississauga, Canada*). The DQ-BSA has the advantage of being detectable only following proteolytic degradation. Consequently, the use of DQ-BSA in combination with cytometry analysis permits the evaluation of complete phagocytosis, which includes not only ingestion by the cells but also proteolytic degradation by these cells. The polymorphonuclear region was selected in accordance with size and granulometry and the specific number of phagocytic cells that completely degrade the DQ-BSA was evaluated.

Production of cytokines and chemokines in the air pouch exudate

The air pouch exudates were conserved at -80 °C for the detection of cytokines and chemokines using the Searchlight Multiplex Assays sample testing service (*Endogen, Woburn, USA*). The following cytokines and chemokines were analyzed: Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, Transforming Growth factor- β (TGF- β), Interferon- γ (IFN- γ), Tumor necrosis factor- α (TNF- α), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) and regulated upon activation normal T cells express and presumably secreted (RANTES).

Statistical analysis

The air pouch experiments were performed with a minimal amount of 10 mice/group and two independent experiments. The statistical analyses of data were done using the software JMP IN version 5.1 (*SAS Institute, Montréal, Canada*).

RESULTS

MPM inhibits LPS-induced neutrophil attraction in vivo

Previously, the dose-response curve of MPM efficiency in the ACD model had indicated optimal anti-inflammatory effect with 20% (w/v) [33]. Consequently in

this study, MPM was used at a concentration of 20% (w/v). It has been demonstrated in the air pouch model responding to LPS that the maximum leukocyte infiltration occurs following 6 hours incubation [36]. To investigate the effect of MPM, mice received *p.o.* water or MPM on a daily basis, 2 weeks prior to LPS stimulation. Following a 6-hour treatment with LPS, exudates were harvested to evaluate neutrophil influx. As illustrated in Figure 1, MPM significantly inhibits neutrophil extravasation which is demonstrated by the reduction of cell infiltration following LPS injection in the air pouch. The number of cells/pouch recruited following LPS injection in mice that received water and MPM was $17.7 \times 10^6 \pm 3.4 \times 10^6$ and $8.9 \times 10^6 \pm 2.1 \times 10^6$, respectively, representing a 50% reduction for the MPM group ($p < 0.01$). Moreover, the number of cells/pouch recruited of both negative (PBS injected mice: $2.3 \times 10^6 \pm 0.4 \times 10^6$) and positive (LPS injected mice: $20.0 \times 10^6 \pm 5.6 \times 10^6$) control groups (figure 1), indicates that LPS induces an important leukocyte infiltration that is not observed with PBS treatment alone.

Effect of MPM consumption on phagocytosis activity

The phagocytosis activity was investigated to explore the effect of MPM on the activation status of neutrophils previously stimulated by LPS. MPM consumption has no effect on neutrophil phagocytosis activity (Figure 2). Neutrophils recruited in the air pouch 6 hours following LPS injection exhibit a phagocytosis activity of $63 \pm 5.9\%$ and $61 \pm 9.1\%$ in mice receiving water and MPM, respectively, indicating no regulatory effects induced by MPM consumption on neutrophil activity.

Effect of MPM on cytokine and chemokine production

Leukocyte migration in the air pouch is induced by production of mediators such as cytokines and chemokines. Evaluation of their expression in the air pouch cell exudates indicated that MPM significantly reduces production of both cytokines and chemokines in comparison with water control group (Table 1). All cytokines and chemokines tested were reduced in MPM-fed mice, except IL-2 that showed a 16% increase compared to water control group (not statistically significant). On

average, MPM decreased cytokine and chemokine production by 60% and 75%, respectively. These observations indicate an inhibition of leukocyte attracting mediators. The pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF α are the highest reduced following MPM treatment with reduction of 79%, 84% and 74%, respectively.

DISCUSSION

MPM is a whey-fermented product that, according to its composition, should exhibit potential anti-inflammatory properties. Anti-inflammatory effects of MPM have previously been reported in the ACD model where MPM significantly reduced ear inflammation in prophylactic and therapeutic settings [33]. The LPS-induced murine air pouch model was used in order to investigate the therapeutic potential and mechanism of action of MPM on inflammatory diseases, in particular its ability to attenuate neutrophil influx *in vivo*.

A 6 hours incubation following LPS injection was allowed before recovering the circulating cells. This period represents the peak recruitment of infiltrating cells in a LPS-induced air pouch, which return to control levels within 12 hours [36]. The results obtained with the air pouch model demonstrated, in agreement with those previously obtained with the ACD model, a significant inhibition of neutrophil extravasation following MPM consumption [33]. Here, a 50% reduction of neutrophil infiltration was observed in comparison with the water-fed group following LPS injection. A 6-hour period is sufficient to allow the release of bone marrow cells into circulation and to attract neutrophil cells in the peripheral blood to emigrate into the air pouch [36]. Consequently, the anti-inflammatory effect of MPM could be due to the inhibition of neutrophil release from bone marrow or inhibition of neutrophil migration in the inflammatory site or a combination of both. However, it was previously demonstrated in the ACD model that blood leukocyte cell counts, mostly composed of neutrophils, were

higher in the MPM group than in the water control group. Also, myeloperoxidase content, one of the major enzyme found in neutrophils, was lower in mice ears of the MPM-treated group [33]. These results suggest that the mechanism of action by MPM is related, at least partially, to inhibition of neutrophil extravasation.

In this study, we found that the phagocytosis potential of neutrophils was not affected by MPM consumption, indicating that the reduction of inflammatory cells is not linked to an energy state of these cells at the inflammatory site. This also suggests that neutrophils are still able to fully exert phagocytosis, thus to defend the organism against a pathogen invasion despite the anti-inflammatory effect of MPM. In conclusion, MPM does not act via the immunosuppression of cell activities.

Cytokines and chemokines play many roles in inflammation. The primary role of these mediators in the air pouch model is related to leukocyte attraction. The pro-inflammatory cytokine TNF- α is one of the first to be detected locally in the air pouch before leukocyte recruitment [38]. TNF- α leads to production of chemokines by endothelial cells, fibroblasts and macrophages that constituted the pre-formed structure of the air pouch. The initial production of both TNF- α and chemokines is the first signal to recruit neutrophils [38, 39]. In the air pouch model, MPM consumption significantly reduced TNF- α by 74%. Moreover, MPM treatment also considerably inhibited the production of chemokines MIP-1 α , MIP-2 and RANTES with reductions of 78%, 66% and 82%, respectively. These results suggest that the primary mediators produced in inflammatory reaction are inhibited following MPM consumption, explaining the reduction of neutrophil migration.

The pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 and IFN- γ are responsible for amplification of the inflammatory reaction. These cytokines are produced by activated cells in response to diverse stimuli to attract and activate inflammatory cells such as lymphocytes, monocytes and neutrophils. IL-1 β , IL-6,

IL-12, IL-18 and INF- γ were reduced by 79%, 84%, 62%, 43% and 39%, respectively following MPM treatment. The MPM consumption considerably reduced the production of these cytokines which, consequently, inhibited the amplified reaction in recruiting inflammatory cells in the air pouch. An important reduction of 51% in GM-CSF within the air pouch exudate in the MPM group compared to water group indicates inhibition of an important cytokine that is implicated in neutrophil generation and extravasation. GM-CSF is implicated in the generation of granulocytes and monocytes/macrophages from bone marrow which regulate both the accumulation and activities of neutrophils. GM-CSF increases the neutrophil extravasation by stimulating expression of adhesion molecules on these inflammatory cells. In addition, GM-CSF can prolong survival of neutrophils by inhibiting their apoptosis [40, 41].

The reduction of all of these chemokines and cytokines following MPM consumption suggests a regulation of cell-secreted mediators and consequently, a regulation of the inflammatory reaction. This study demonstrates that MPM can inhibit production of Th1 cytokines and chemokines which are the signal for leukocyte extravasation. In order to examine the potential of MPM to increase regulatory cytokine production or to stimulate a Th2 profile of cytokines, we have also evaluated the production of IL-4, IL-13 as well as IL-10 and TGF- β . The anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13 were also reduced following MPM consumption. The reduction of these cytokines confirmed an absence of immune stimulation from the Th2 cytokine profile. However, despite their anti-inflammatory properties, it has been demonstrated that these cytokines contribute to many neutrophil activities including phagocytosis and migration [42]. MPM clearly inhibits production of the cytokine repertoire that can contribute to extravasation of cells within the air pouch. However, reduction of IL-10 and TGF- β , which are regulatory cytokines, allows the conclusion that the MPM mechanism of action is not related to production of regulatory cytokines. It is possible that regulatory T cells are produced following MPM consumption;

however, these cells would not act by producing regulatory cytokines but rather through another mechanism.

IL-2 is the only cytokine tested that was not reduced following MPM consumption. This cytokine is essential in the homeostasis of lymphocytes and development of T-lymphocytes. The absence of IL-2 suppression by MPM suggests that its mechanism of action is specifically associated with the inhibition of neutrophil extravasation and not related to the ability of lymphocytes to produce cytokines and activate other lymphocytes. Absence of IL-2 inhibition also indicates that the lining environment from the air pouch was not completely disrupted following MPM consumption. These observations suggest that the mechanism of action for MPM is not through immunosuppression, as speculated in the ACD model in which no side effects associated with glucocorticoid treatment were observed following MPM consumption [33]. It was also demonstrated in the ACD model that MPM inhibited cytokines produced by macrophages but had no effect on those produced by lymphocytes (*Beaulieu et al., in preparation*). Moreover, it is known that IL-2 is involved in the development of regulatory cells [43]. As previously mentioned, it is not excluded that MPM could stimulate T regulatory cell production. However, if these cells are produced, they would act by a different mechanism than regulatory cytokine production. Results obtained in the murine air pouch model suggest that a sub-population of lymphocytes, which possesses a regulatory role, is implicated in the MPM mechanism of action for inflammatory diseases. These regulatory lymphocytes could inhibit production of cytokines and chemokines by macrophages and fibroblasts or could inhibit epithelium formation that is constituted of macrophages and fibroblasts furthermore inhibiting the production of mediators.

Many MPM components could be implicated in this anti-inflammatory effect. Lactic acid bacteria, whey proteins and peptides have demonstrated various anti-inflammatory effects in different animal models. However, it has

been previously demonstrated that whey isolates do not exhibit the same immunomodulatory effects than those observed with MPM [44]. Also, the lactic acid bacteria strain used in the MPM fermentation has previously been tested in the ACD model and demonstrated an anti-inflammatory effect, however not as significant as those obtained with MPM (data not shown). These results show that synergy between all of MPM components is essential for the immunomodulatory and anti-inflammatory effects of MPM.

In conclusion, MPM consumption induces the reduction of neutrophil extravasation in a tissue following stimulation, nevertheless without inhibiting phagocytosis activity of the attracted neutrophils. The same conclusion was previously observed in the contact dermatitis model [33]. These results suggest that MPM would be an interesting natural treatment for inflammatory diseases like neutrophilic dermatosis (sweet syndrome) resulting from Crohn's disease complication [45]. Interestingly, the inflammatory mechanism implicated in the air pouch model is similar to the one involved in an adjuvant-induced arthritis model [46]. Consequently, it is conceivable that MPM could permit an important reduction of inflammation and arthritic pain in patients without an associated immunosuppression.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr. Martin Pelletier for the help in adapting the air pouch model. This study was funded by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Strategic Grant STP 246405-1. JB holds a Ph.D. «Fond de recherche en santé du Québec (FRSQ)» award and DG is scholar-from FRSQ.

Table 1. Cytokine and chemokine values (pg/ml) in air pouch exudates.

(** p<0.01, * p<0.05, † p<0.1) (n=10)

Cytokines	Water	MPM	Relative expression vs water group (%)
IL-1 β	212.9 \pm 29.5	45.7 \pm 21.1	21 **
IL-2	68.5 \pm 8.9	79.4 \pm 12.3	116
IL-4	14.5 \pm 4.9	5.1 \pm 1.2	36 †
IL-6	50318.2 \pm 10733.2	5833.5 \pm 5433.8	16 **
IL-10	1840.7 \pm 329.1	624.1 \pm 436	34 *
IL-12	91.1 \pm 14.7	34.5 \pm 21	38 *
IL-13	50.9 \pm 11.8	21 \pm 2.4	41 *
IL-18	174.6 \pm 34.5	98.8 \pm 19.2	57 †
TNF α	241.5 \pm 16.4	62.2 \pm 27.2	26 **
IFN γ	51.9 \pm 9.4	31.7 \pm 9	61 *
GM-CSF	52.6 \pm 4.9	25.7 \pm 10.8	49 *
TGF β	394.6 \pm 13.3	227.9 \pm 94.6	58 †
Chemokines	Water	MPM	Relative expression vs water group (%)
MIP-1 α	126.2 \pm 15.5	28.3 \pm 4.2	22 **
MIP-2	365.7 \pm 83.7	123 \pm 63.3	34 *
RANTES	2815.1 \pm 316.3	515.2 \pm 190.5	18 **

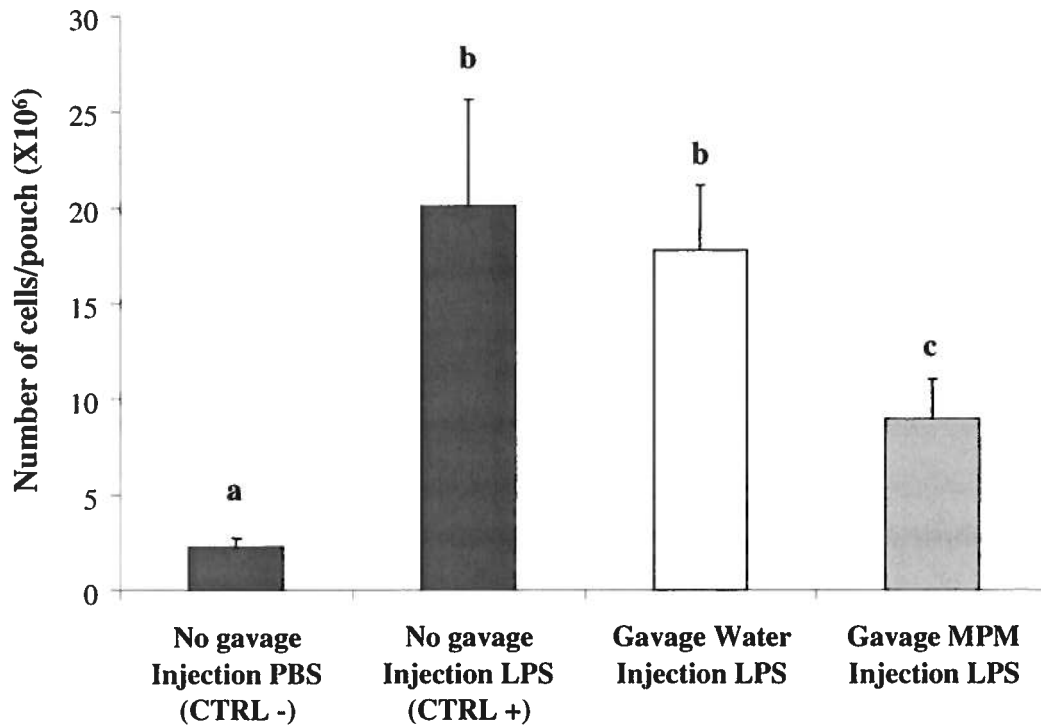


Figure 1. Leukocyte infiltration in the air pouch exudates.

Dorsal air pouches were raised in mice before injection of PBS (CTRL) or LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) into the pouch as described in *Materials and Methods*. Both mice groups treated with water or MPM *p.o.* received an injection of LPS into the pouch. Six hours later, the exudates were harvested and total number of leukocytes was calculated. A significant statistical difference between groups is represented by the use of different letters (a,b,c) ($p < 0.01$). Results are means \pm SEM ($n=10$).

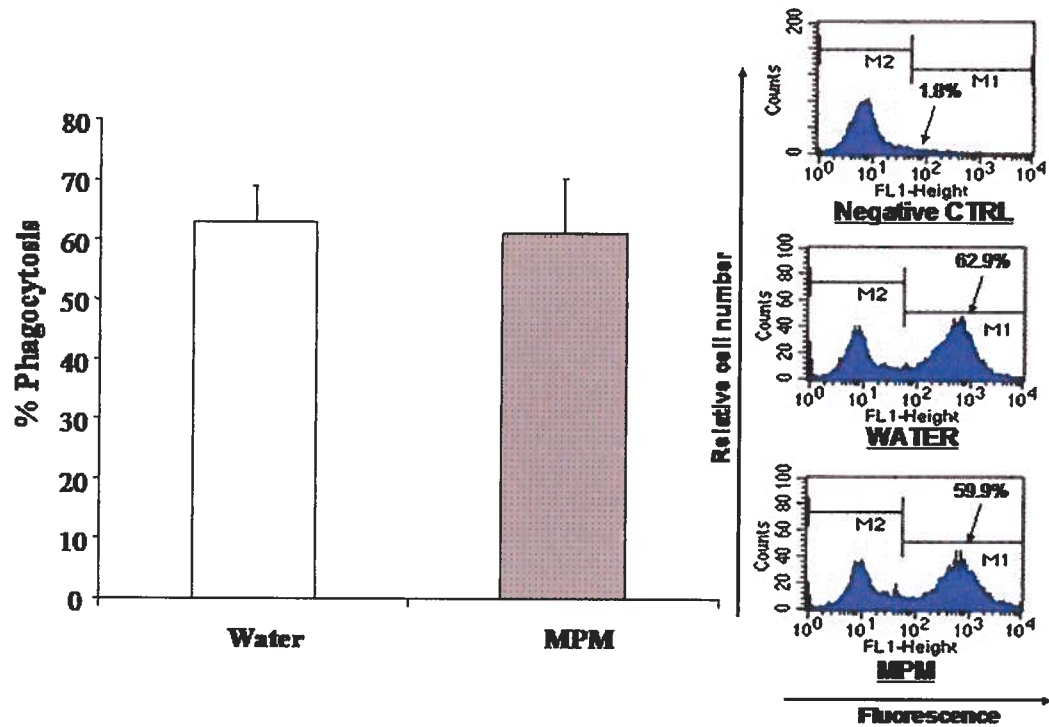


Figure 2. Phagocytosis activity of leukocytes recruited in the exudates.

Air pouches were created in water and MPM treated groups as described in *Materials and Methods*. The exudates were collected 6 hours following LPS injection and the phagocytosis activity of these cells was measured using DQ-BSA Green (*Molecular Probes, USA*), as shown in panel A. Panel B shows one representative experiment out of three illustrating cell phagocytosis activity. The M1 gate represents the number of fluorescent cells, which are the cells that have incorporated and degraded the DQ-BSA Green, indicating phagocytic cells. Results are means \pm SEM (n=10).

REFERENCES

1. Huber D, Balda MS, Matter K. Transepithelial migration of neutrophils. *Invasion Metastasis* 1998; 18:70-80.
2. Kobayashi SD, Voyich JM, Burlak C, DeLeo FR. Neutrophils in the innate immune response. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005; 53:505-17.
3. Oeser A, Chung CP, Asanuma Y, Avalos I, Stein CM. Obesity is an independent contributor to functional capacity and inflammation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52:3651-9.
4. Toker S, Shirom A, Shapira I, Berliner S, Melamed S. The association between burnout, depression, anxiety, and inflammation biomarkers: C-reactive protein and fibrinogen in men and women. *J Occup Health Psychol* 2005; 10:344-62.
5. Bruunsgaard H. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. *J Leukoc Biol* 2005; 78:819-35.
6. Calder PC, Kew S. The immune system: a target for functional foods? *Br J Nutr* 2002; 88 Suppl 2:S165-77.
7. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J, et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). *J Agric Food Chem* 2006; 54:8604-10.
8. Yeh CL, Hsu CS, Yeh SL, Lin MT, Chen WJ. Dietary glutamine supplementation reduces cellular adhesion molecule expression and tissue myeloperoxidase activity in mice with gut-derived sepsis. *Nutrition* 2006; 22:408-13.
9. Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Diaz-Ropero MP, et al. Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, in the TNBS model of rat colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11:5185-92.
10. Osman N, Adawi D, Molin G, Ahrne S, Berggren A, Jeppsson B. *Bifidobacterium infantis* strains with and without a combination of oligofructose and inulin (OFI) attenuate inflammation in DSS-induced colitis in rats. *BMC Gastroenterol* 2006; 6:31.

11. Hung SL, Lee YY, Liu TY, Peng JL, Cheng YY, Chen YT. Modulation of phagocytosis, chemotaxis, and adhesion of neutrophils by areca nut extracts. *J Periodontol* 2006; 77:579-85.
12. Beaulieu J, Dupont C, Lemieux P. Whey proteins and peptides: beneficial effects on immune health. *Therapy* 2006; 3:1-10.
13. Gattegno L, Migliore-Samour D, Saffar L, Jolles P. Enhancement of phagocytic activity of human monocytic-macrophagic cells by immunostimulating peptides from human casein. *Immunol Lett* 1988; 18:27-31.
14. Jaziri M, Migliore-Samour D, Casabianca-Pignede MR, Keddad K, Morgat JL, Jolles P. Specific binding sites on human phagocytic blood cells for Gly-Leu-Phe and Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr, immunostimulating peptides from human milk proteins. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1160:251-261.
15. Miyauchi H, Hashimoto S, Nakajima M, Shinoda I, Fukuwatari Y, Hayasawa H. Bovine lactoferrin stimulates the phagocytic activity of human neutrophils: identification of its active domain. *Cell Immunol* 1998; 187:34-37.
16. Shinoda I, Takase M, Fukuwatari Y, Shimamura S, Koller M, Konig W. Effects of lactoferrin and lactoferricin on the release of interleukin 8 from human polymorphonuclear leukocytes. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996; 60:521-523.
17. Li EW, Mine Y. Immunoenhancing effects of bovine glycomacropeptide and its derivatives on the proliferative response and phagocytic activities of human macrophagelike cells, U937. *J Agric Food Chem* 2004; 52:2704-2708.
18. Wong CW, Seow HF, Husband AJ, Register GO, Watson DL. Effects of purified bovine whey factors on cellular immune functions in ruminants. *Vet Immunol Immunopathol* 1997; 56:85-96.
19. Yoo YC, Watanabe R, Koike Y, Mitobe M, Shimazaki K, Watanabe S, et al. Apoptosis in human leukemic cells induced by lactoferricin, a bovine milk protein-derived peptide: involvement of reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237:624-628.
20. Machnicki M, Zimecki M, Zagulski T. Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 in vivo. *Int J Exp Pathol* 1993; 74:433-439.

21. Hayashida K, Kaneko T, Takeuchi T, Shimizu H, Ando K, Harada E. Oral administration of lactoferrin inhibits inflammation and nociception in rat adjuvant-induced arthritis. *J Vet Med Sci* 2004; 66:149-154.
22. Kimber I, Cumberbatch M, Dearman RJ, Headon DR, Bhushan M, Griffiths CE. Lactoferrin: influences on Langerhans cells, epidermal cytokines, and cutaneous inflammation. *Biochem Cell Biol* 2002; 80:103-107.
23. Mattsby-Baltzer I, Roseanu A, Motas C, Elverfors J, Engberg I, Hanson LA. Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells. *Pediatr Res* 1996; 40:257-262.
24. Dial EJ, Romero JJ, Headon DR, Lichtenberger LM. Recombinant human lactoferrin is effective in the treatment of *Helicobacter felis*-infected mice. *J Pharm Pharmacol* 2000; 52:1541-1546.
25. Guillen C, McInnes IB, Vaughan D, Speekenbrink AB, Brock JH. The effects of local administration of lactoferrin on inflammation in murine autoimmune and infectious arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:2073-2080.
26. Otani H, Monnai M, Hosono A. Bovine kappa-casein as inhibitor of the proliferation of mouse splenocytes induced by lipopolysaccharide stimulation. *Milchwissenschaft* 1992; 47:512-515.
27. Otani H, Odashima M. Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes by lacto- and ovotransferrins. *Food Agri Imm* 1997; 9:193-201.
28. Otani H, Monnai M, Kawasaki Y, Kawakami H, Tanimoto M. Inhibition of mitogen-induced proliferative responses of lymphocytes by bovine kappa-caseinoglycopeptides having different carbohydrate chains. *J Dairy Res* 1995; 62:349-357.
29. Erickson KL, Hubbard NE. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J Nutr* 2000; 130:403S-409S.
30. Christensen HR, Frokiaer H, Pestka JJ. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* 2002; 168:171-8.

31. Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277:50959-50965.
32. Chapat L, Chemin K, Dubois B, Bourdet-Sicard R, Kaiserlian D. *Lactobacillus casei* reduces CD8+ T cell-mediated skin inflammation. *Eur J Immunol* 2004; 34:2520-8.
33. Beaulieu J, Dupont C, Lemieux P. Anti-inflammatory potential of a malleable matrix composed of fermented whey proteins and lactic acid bacteria in an atopic dermatitis model. *J Inflamm (Lond)* 2007; 4:6.
34. Selye H. Use of granuloma pouch technic in the study of antiphlogistic corticoids. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953; 82:328-33.
35. Edwards JC, Sedgwick AD, Willoughby DA. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. *J Pathol* 1981; 134:147-56.
36. Vandal K, Rouleau P, Boivin A, Ryckman C, Talbot M, Tessier PA. Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 2003; 171:2602-9.
37. Pelletier M, Bouchard A, Girard D. In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J Immunol* 2004; 173:7521-30.
38. Garcia-Ramallo E, Marques T, Prats N, Beleta J, Kunkel SL, Godessart N. Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. *J Immunol* 2002; 169:6467-73.
39. Tessier PA, Naccache PH, Clark-Lewis I, Gladue RP, Neote KS, McColl SR. Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha. *J Immunol* 1997; 159:3595-602.
40. Yong KL, Linch DC. Differential effects of granulocyte- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors (G- and GM-CSF) on neutrophil adhesion in vitro and in vivo. *Eur J Haematol* 1992; 49:251-9.

41. Weisbart RH, Golde DW, Clark SC, Wong GG, Gasson JC. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a neutrophil activator. *Nature* 1985; 314:361-3.
42. Girard D, Paquin R, Beaulieu AD. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem J* 1997; 325 (Pt 1):147-53.
43. Chen X, Oppenheim JJ, Winkler-Pickett RT, Ortaldo JR, Howard OM. Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3(+)CD4(+)CD25(+) T regulatory cells in vivo and enhances their capacity to suppress EAE. *Eur J Immunol* 2006; 36:2139-49.
44. Beaulieu J, Dubuc R, Beaudet N, Dupont C, Lemieux P. Immunomodulation by a Malleable Matrix composed of fermented whey protein and lactic acid bacteria. *J Med Food* 2007; 10.
45. Callen JP. Neutrophilic dermatoses. *Dermatol Clin* 2002; 20:409-19.
46. De Brito FB, Corry DG, Moore AR, Howat DE, Willoughby DA. Polyarthritis and the air pouch reaction: dissimilarity of adjuvant and collagen models. *Immunopharmacology* 1988; 15:123-30.

Chapitre 7. Résultats Supplémentaires

7.1 Animaux immunocompétents

7.1.1 Production de cytokines par les splénocytes

La production de diverses cytokines suite aux gavages d'animaux sains permet d'obtenir de nombreuses indications concernant le mécanisme d'action impliqué dans l'effet immunomodulateur de la MPM. Le profil des cytokines analysées est très variable et permet ainsi, d'obtenir de sérieuses réponses sur la(les) voie(s) immunitaire(s) stimulée(s) et/ou réprimée(s). Ces cytokines ont été évaluées dans la rate des souris après deux semaines de gavages avec de l'eau ou des MPM. La production de ces médiateurs a été mesurée par le service d'évaluation de la compagnie Endogen (Searchlight Multiplex ELISA). La méthode de préparation des échantillons et l'analyse des cytokines ont été effectuées tel que décrit au chapitre 6. (Référence : Beaulieu, J. *et al.* 2007, **Inhibition of neutrophil infiltration by a malleable protein matrix of lactic acid bacteria-fermented whey proteins *in vivo*. *Inflammation Research***. (accepté pour publication juin 2007)).

TABEAU 9 : CONCENTRATION MOYENNE DES CYTOKINES (PG/ML) DANS LA RATE DE SOURIS IMMUNOCOMPÉTENTES.

Cytokines	Eau	MPM	Expression relative vs groupe eau (%)
IL-1 α	472,7 \pm 41,9	490,1 \pm 36,65	104
IL-1 β	285,9 \pm 13,2	245,2 \pm 28,6	86
IL-2	30,1 \pm 3,6	28,6 \pm 5,4	95
IL-4	39,3 \pm 3,0	39,1 \pm 3,6	99
IL-5	147,7 \pm 17,2	158,7 \pm 11,9	107
IL-6	150,2 \pm 17,4	157,0 \pm 5,9	105
IL-10	30,5 \pm 0,6	25 \pm 0,7	82 **
IL-12	10,3 \pm 0,8	6,9 \pm 1,0	67 *
IL-17	11,6 \pm 1,4	11,2 \pm 2,0	96
IL-18	1787,7 \pm 86,2	2077,2 \pm 121,6	117 *
IL-23	34,8 \pm 2,2	57,6 \pm 6,5	166 *
IL-27	76,3 \pm 7,9	79,4 \pm 2,4	104
TNF α	58,5 \pm 5,5	61,9 \pm 2,1	106
IFN γ	615,8 \pm 50,2	582,3 \pm 55,3	94
GM-CSF	1,9 \pm 0,4	2,2 \pm 0,3	117

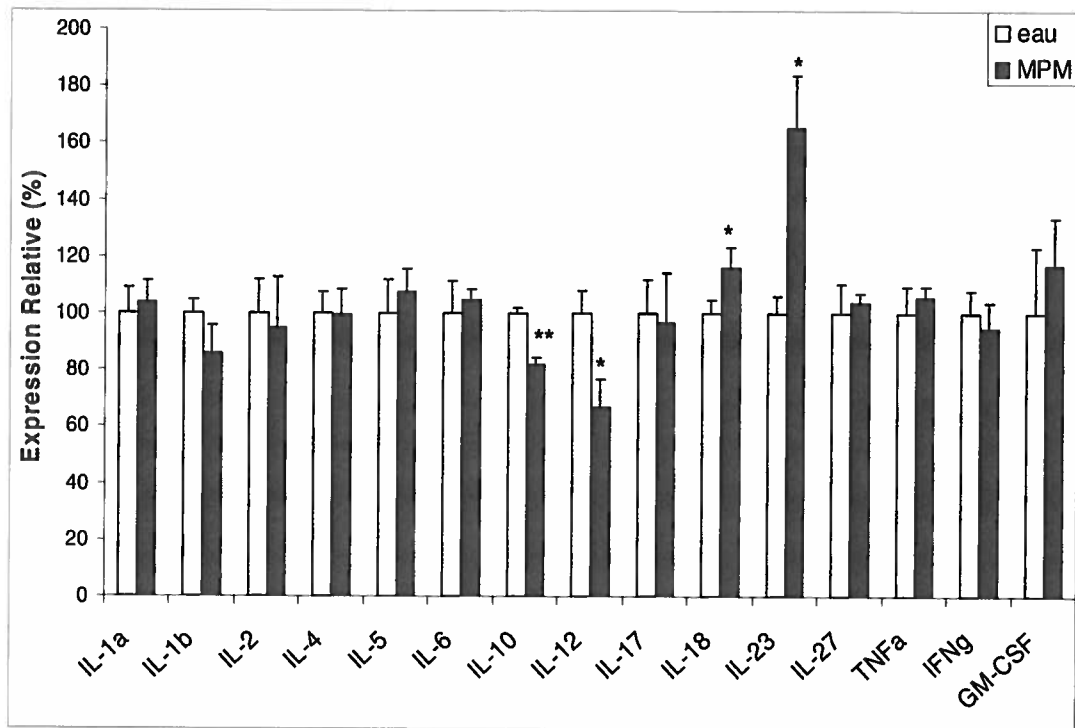


FIGURE 3. EXPRESSION RELATIVE MOYENNE (%) DES CYTOKINES DANS LA RATE DE SOURIS IMMUNOCOMPÉTENTES.

De façon générale, la consommation de MPM chez des animaux sains n'affecte pas la production des cytokines de la voie Th1. Les cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF α et IFN γ ne sont pas affectées. Cependant, il y a une inhibition importante de la production de IL-12 (33%) alors que la production de IL-18 est plutôt augmentée (17%) par la consommation de MPM. Ces résultats suggèrent que la MPM stimule l'immunité innée via un mécanisme d'action différent de la voie Th1 et que la cytokine IL-18 jouerait un rôle dans ce mécanisme. La production des cytokines de la voie Th2, IL-4 et IL-5, n'est pas affectée suite à la consommation de MPM indiquant un potentiel de régulation des cellules impliquées essentiellement dans la défense innée et non dans la défense humorale. La production de IL-10 est diminuée (18%) par la consommation de MPM confirmant que les MPM ne stimule pas la voie Th2 mais également que le mécanisme d'action de la MPM n'est pas reliée à la stimulation de la production

de cytokines, du moins IL-10, par les cellules T régulatrices. Cependant, la MPM possède un effet de stimulation important de la cytokine IL-23 (66%) suggérant un rôle important de cette cytokine dans le mécanisme d'action impliqué dans la stimulation de l'immunité par la consommation de MPM. Ces résultats seront plus amplement discutés au chapitre 8.

7.1.2 Caractérisation des populations lymphocytaires dans la rate et les plaques de Peyer

L'évaluation des différentes populations lymphocytaires dans les organes suite aux gavages d'animaux sains permet d'identifier s'il y a implication d'une sous-population de lymphocytes dans le mécanisme d'action de la MPM. Les souris ont été sacrifiées 2 semaines après le gavage quotidien d'eau ou de MPM et les cellules des organes (plaques de Peyer et rate) ont été isolées. Brièvement, les organes sont conservés dans du milieu RPMI (*Sigma Aldrich Canada, Oakville*) jusqu'à l'isolement des cellules. Les plaques de Peyer sont traitées deux fois avec 1,5 mg/ml de collagénase de type I (*Invitrogen, Burlington*) dans le milieu RPMI à 37°C (5% CO₂) pour 30 minutes (les surnageants sont collectés après chaque traitement). Les cellules sont isolées des organes par passage sur des filtres de nylon 100 µm. Pour la rate, lyser les globules rouges en ajoutant 5 ml de solution de lyse de globules rouges (ACK) aux cellules isolées. Incuber 5 min sur glace et ensuite, ajouter 5 ml de PBS (*Sigma Aldrich Canada, Oakville*). Ajuster le nombre de cellules à 10X10⁶ lymphocytes vivants/ml dans du PBS-3% SVF (*Invitrogen, Burlington*) puis incuber les cellules avec les anticorps appropriés (voir plus bas) durant 20 minutes dans le noir. Effectuer l'analyse des populations lymphocytaires en cytométrie (*Epics XL Flow cytometry Coulter, Beckman Coulter*).

- Anti-CD4 FITC utilisé à 0,05 µg/test. (*Groovy blue Genes, Vineland*)
- Anti-CD8a PEcy5 utilisé à 0,15 µg/test. (*Groovy blue Genes, Vineland*)
- Anti-CD25 PE utilisé à 0,25 µg/test. (*Groovy blue Genes, Vineland*)

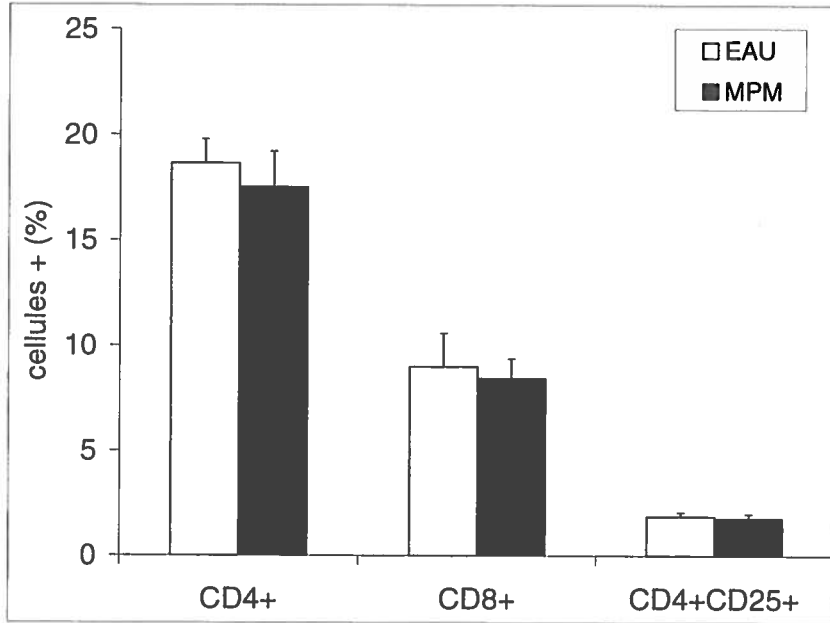


FIGURE 4. ÉVALUATION DES POPULATION LYMPHOCYTAIRES DANS LA RATE DES SOURIS IMMUNOCOMPÉTENTES.

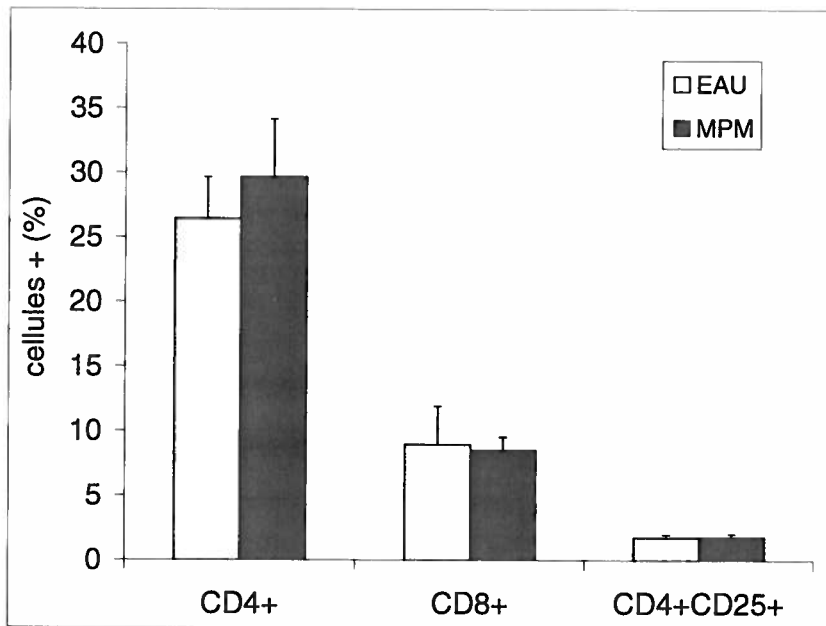


FIGURE 5. ÉVALUATION DES POPULATION LYMPHOCYTAIRES DANS LES PLAQUES DE PEYER DES SOURIS IMMUNOCOMPÉTENTES.

L'identification des populations de lymphocytes T dans la rate permet d'évaluer de façon systémique l'impact de la MPM sur l'immunité alors que cette évaluation dans les plaques de Peyer permet d'identifier si la MPM stimule l'immunité intestinale qui par la suite, a des répercussions au niveau systémique. L'évaluation des populations de lymphocytes T dans les divers organes démontre que le mécanisme d'action de la MPM ne semble pas relié à l'augmentation ou l'inhibition des lymphocytes CD4+ ou CD8+. De plus, il est connu que différentes souches de probiotiques peuvent stimuler l'immunité via l'augmentation de la production des cellules T régulatrices. Or, les résultats démontrent que la MPM ne favorise pas la production de cellules T régulatrices CD4+CD25+. Ces résultats seront discutés au chapitre 8.

7.2 Modèle de la dermatite de contact

7.2.1 Production de cytokines par les splénocytes

La production de cytokines dans le modèle de la dermatite de contact a été évaluée suite à la publication de l'article concernant ce modèle et ce, dans le but d'obtenir une meilleure caractérisation de l'effet anti-inflammatoire observé par la MPM. Ces résultats sont importants dans l'évaluation du mécanisme d'action de la MPM et se doivent d'être présentés et discutés. La production de ces médiateurs a été mesurée par le service d'évaluation de la compagnie Endogen (Searchlight Multiplex ELISA). La méthode de préparation des échantillons et l'analyse des cytokines ont été effectuées tel que décrit au chapitre 6. (Référence : Beaulieu, J. *et al.* 2007, **Inhibition of neutrophil infiltration by a malleable protein matrix of lactic acid bacteria-fermented whey proteins *in vivo***. *Inflammation Research*. (accepté pour publication juin 2007)).

TABLEAU 10 : CONCENTRATION MOYENNE DES CYTOKINES (PG/ML) DANS LA RATE DE SOURIS DANS LE MODÈLE DE LA DERMATITE DE CONTACT.

Cytokines	Eau	MPM	Expression relative vs groupe eau (%)
IL-1 β	1507,7 \pm 51,9	1074,6 \pm 157,0	59,7 *
IL-2	38,1 \pm 6,8	49,6 \pm 13,1	130
IL-4	13,7 \pm 0,9	10,6 \pm 1,4	77,4 †
IL-6	5038 \pm 215,3	3141,4 \pm 730,9	53,6 *
IL-10	1561,5 \pm 168,2	926,2 \pm 229,5	59,3 †
IL-12	195,4 \pm 28,8	123,9 \pm 16,4	63,4 *
IL-13	178,7 \pm 14,5	170,7 \pm 18,7	95,5
IL-18	13615,6 \pm 1038,1	9122,4 \pm 1383,9	67 *
TNF α	2272,3 \pm 364,9	1275,4 \pm 262,5	56,1 *
IFN γ	163,4 \pm 13,1	136,3 \pm 19,8	83,4
GM-CSF	976,7 \pm 180,5	534,6 \pm 129,8	54,7 †

* p < 0,05

† p < 0,07

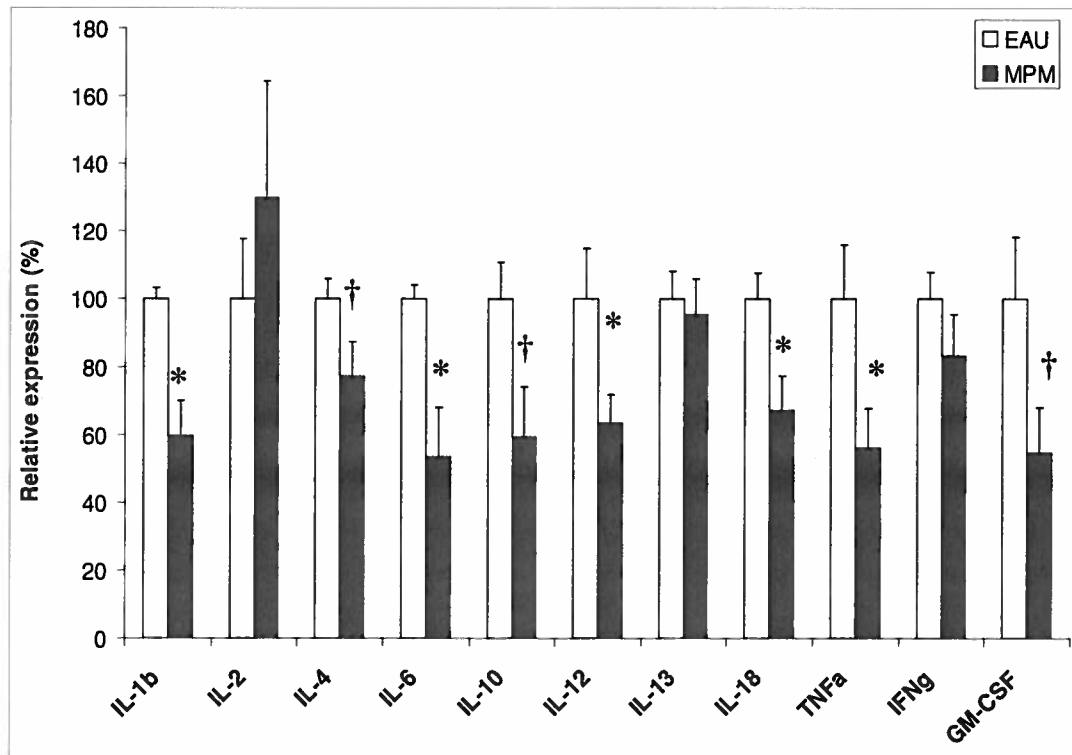


FIGURE 6. EXPRESSION RELATIVE MOYENNE (%) DES CYTOKINES DANS LA RATE DE SOURIS DANS LE MODÈLE DE LA DERMATITE DE CONTACT.

L'évaluation de la production de cytokines dans la rate dans le modèle de dermatite de contact permet d'obtenir de bonnes indications sur le mécanisme d'action potentiel de la MPM. La MPM réduit la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, TNF α et GM-CSF dans ce modèle. Par contre, à l'exception de IL-13, les cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-10 sont aussi réduites indiquant que le mécanisme d'action ne semble pas être relié à une augmentation de la production des cytokines de la voie Th2. À l'inverse, la production de la cytokine IL-2 est maintenue et même, favorisée. IL-2 est la seule des cytokines testées produites par les lymphocytes et dont le rôle est d'activer les lymphocytes suggérant l'implication d'une population lymphocytaire dans ce mécanisme d'action de l'effet anti-inflammatoire. Il est également à noter qu'aucune inhibition de IFN γ a été observée et ce, malgré l'importance de cette cytokine dans le modèle de la dermatite de contact. Ces résultats seront plus amplement discutés au chapitre 8.

7.2.2 Caractérisation des populations lymphocytaires dans la rate

L'évaluation des différentes populations lymphocytaires dans la rate dans le modèle de la dermatite de contact permet de caractériser l'effet de la MPM sur les lymphocytes, cellules primordiales dans le développement de cette pathologie. Tout d'abord, les souris ont été gavées durant 1 semaine avec de l'eau ou la MPM. Par la suite, l'étape de sensibilisation sur l'abdomen a été effectuée avec 100 μ l oxazolone 5% dans acétone et les souris ont été sacrifiées après 5 jours. L'isolement des cellules et l'évaluation des populations lymphocytaires a été effectué tel que décrit précédemment (au point 7.1.2).

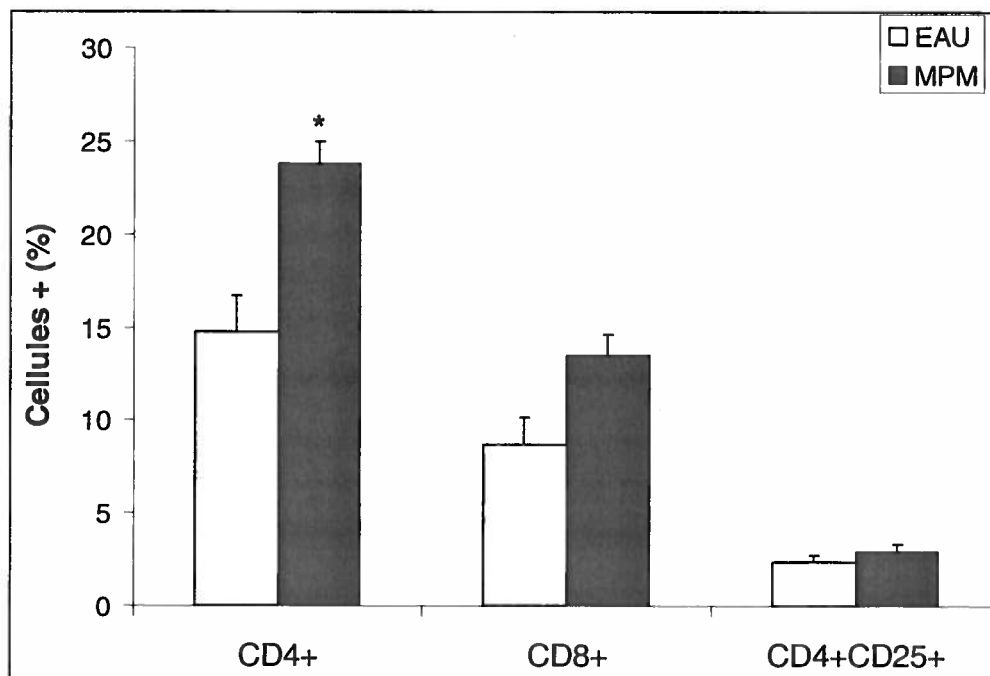


FIGURE 7. ÉVALUATION DES POPULATION LYMPHOCYTAIRES DANS LA RATE DES SOURIS DANS LE MODÈLE DE DERMATITE DE CONTACT.

L'évaluation des populations de lymphocytes T dans le modèle de la dermatite de contact est très important afin de déterminer l'impact de la MPM sur les cellules effectrices responsables de l'amplification ou de la régulation de la maladie. Ce paramètre a été évalué 5 jours après la sensibilisation, temps nécessaire pour le développement de cellules T effectrices dans la rate dans ce modèle. La MPM n'affecte pas le développement des cellules T CD8+, principales cellules effectrices amplifiant la réaction inflammatoire. Il est donc évident que le mécanisme d'action de la MPM dans ce modèle n'est pas relié à l'inhibition de la production de ces cellules effectrices. Par ailleurs, la MPM augmente considérablement le développement des cellules CD4+ qui possèdent un rôle important dans la régulation de la maladie et empêche donc une amplification exagérée de l'inflammation. Cependant, ces cellules CD4+ stimulées par la MPM ne sont pas des cellules T régulatrices CD4+CD25+. Il est donc envisagé que ces cellules CD4+ puissent être des cellules CD4+ effectrices connues pour posséder un rôle important dans la régulation de la maladie. Ces résultats seront plus amplement discutés au chapitre 8.

7.2.3 Modulation de l'expression des gènes des TLR2 et TLR9 dans la rate

La MPM possède de nombreuses composantes pouvant être reconnues par les récepteurs membranaires de type TLR et en particulier, les TLR2 et TLR9. Par conséquent, la MPM possède le potentiel de moduler l'expression des gènes de ces récepteurs dans les cellules immunes. L'ARN extrait de la rate des souris en situation inflammatoire systémique dans le modèle de dermatite de contact a été utilisé afin d'évaluer l'expression des gènes des TLR2 et TLR9. Tout d'abord, l'ARN a été isolé par la méthode d'extraction au Trizol (*Invitrogen, Burlington*) selon les directives du fabricant. Brièvement, les rates sont incubées avec 1 mL de Trizol durant 10 minutes pour lyser les cellules. Par la suite, le culot est incubé avec du chloroforme et le surnageant est ensuite mis en présence d'isopropanol pour faire précipiter l'ARN. Les sels résiduels sont éliminés en lavant le culot d'ARN avec de l'éthanol 95%. L'étape de transcription inverse a été effectuée avec la Superscript RT II Reverse Transcriptase selon les recommandations du fabricant (*Invitrogen, Burlington*). La réaction PCR a été faite selon le protocole de la trousse PCR, Titanium PCR kit (*Clontech, Mountain View*). Le degré d'expression génique est déterminé selon l'intensité des bandes PCR à l'aide du logiciel Scion image et normalisé avec un gène rapporteur, le GADPH. Les amorces utilisées pour les TLR2 et TLR9 sont décrites ci-bas :

TLR2 upstream	5' - GTCTCTGCGACCTAGAAAGTGGA -3'
TLR2 downstream	5' - CGGAGGGAATAGAGGTGAAAGA -3'
TLR9 upstream	5' - GCACAGGAGCGGTGAAGGT -3'
TLR9 downstream	5' - GCAGGGGTGCTCAGTGGAG -3'

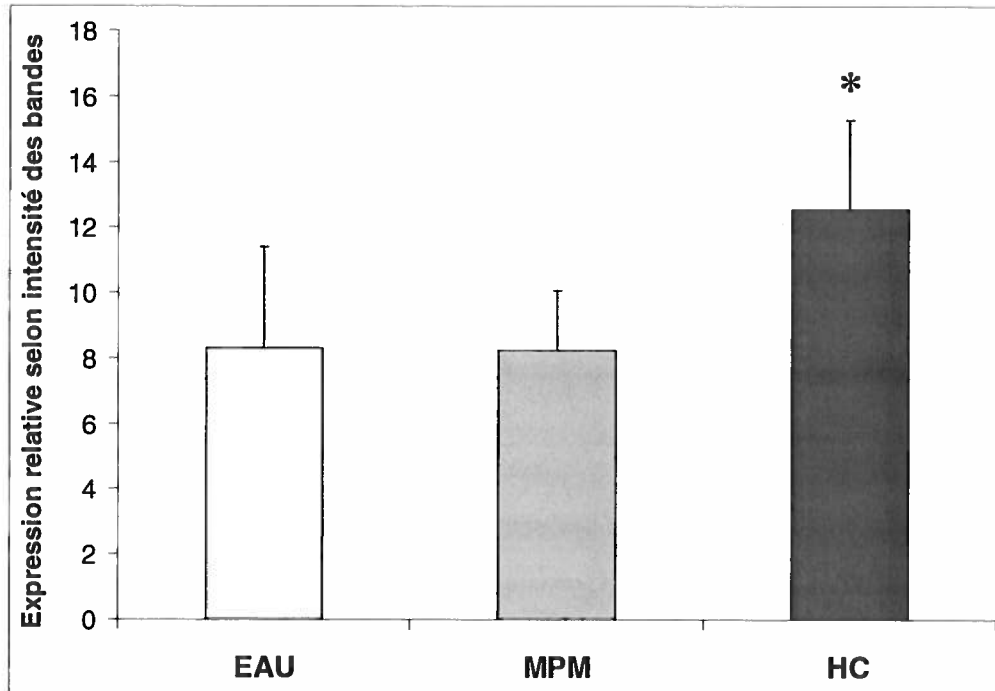


FIGURE 8. DEGRÉ D'EXPRESSION GÉNIQUE DU TLR2 DANS LA RATE DES SOURIS DANS LE MODÈLE DE DERMATITE DE CONTACT.

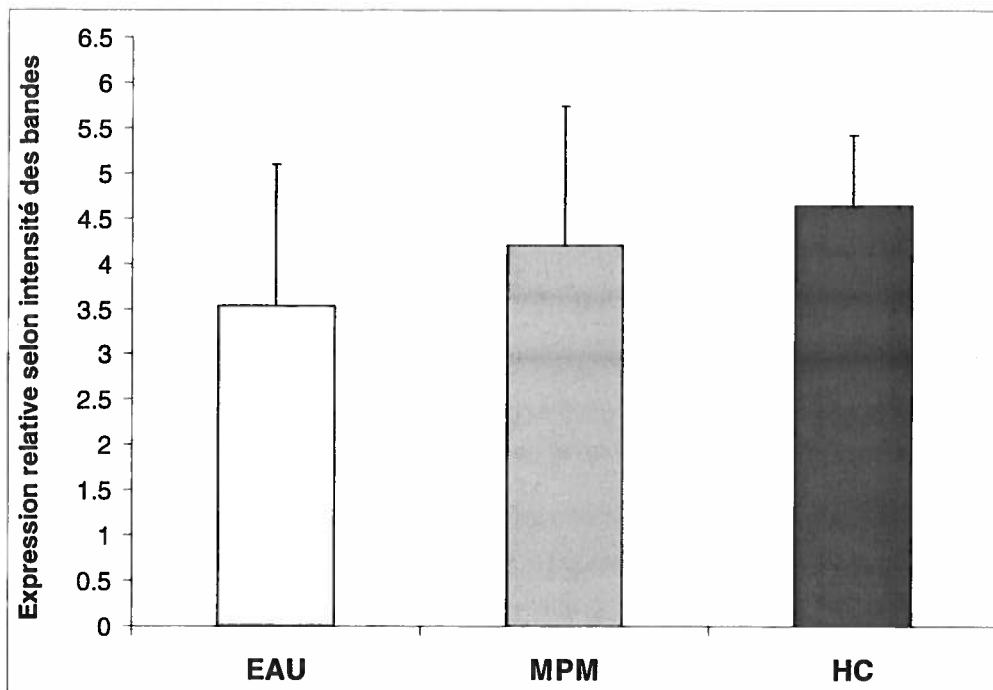


FIGURE 9. DEGRÉ D'EXPRESSION GÉNIQUE DU TLR9 DANS LA RATE DES SOURIS DANS LE MODÈLE DE DERMATITE DE CONTACT.

Ces résultats démontrent que la MPM ne module pas le degré d'expression génique du TLR2. À l'opposé, l'hydrocortisone augmente l'expression des gènes du TLR2 suggérant que le mécanisme d'action de la MPM semble être différent de celui de l'hydrocortisone. D'un autre côté, il a été démontré que ni la MPM ni l'hydrocortisone ne favorise l'expression des gènes du récepteur TLR9. Effectivement, les niveaux d'intensité de l'expression génique du TLR9 sont similaires dans tous les groupes. La MPM ne possède pas un rôle dans la modification de l'expression génique des TLR2 et TLR9. Ces résultats seront discutés au chapitre 8.

7.2.4 Effet anti-inflammatoire de produits dérivés de la MPM

Dans l'objectif d'évaluer quelles composantes de la MPM pourraient être responsables de l'effet anti-inflammatoire observé, différents MPM ont été testés dans le modèle de la dermatite de contact ainsi que la bactérie *Lactobacillus kefiranofaciens R2C2* utilisée pour la fermentation du lactosérum. Les différents produits et MPM testés varient en composition dû aux différences dans les temps de fermentation permettant une protéolyse plus ou moins importante. Le tableau 12 décrit les caractéristiques de chacun des produits testés. Le modèle préventif de la dermatite de contact tel que décrit au chapitre 5 a été utilisé pour cette étude (Référence : Beaulieu, J. *et al.* 2007, **Anti-inflammatory potential of a malleable matrix composed of fermented whey proteins and lactic acid bacteria in an atopic dermatitis model.** *Journal of Inflammation.* 4 :6.)

TABEAU 11 : CARACTÉRISTIQUES DES DIFFÉRENTS PRODUITS TESTÉS DANS LE MODÈLE DE DERMATITE DE CONTACT.

Produits	Caractéristiques
EAU	Contrôle négatif
MPM Lot PC010	Lot industriel fermentation <u>16h</u> Protéines de lactosérum, dégradation minimale
MPM Lot FB026	Lot industriel fermentation <u>12h</u> Protéines de lactosérum, dégradation minimale
MPMexp 48h	Lot expérimental fermentation <u>48h</u> Protéines de lactosérum + peptides lactosérum
<i>L.kefiranofaciens</i> R2C2	Bactéries utilisées dans la fabrication MPM Concentration $\sim 10^8$ bactéries/souris
Hydrocortisone	Contrôle positif; dose ~ 1 mg/souris

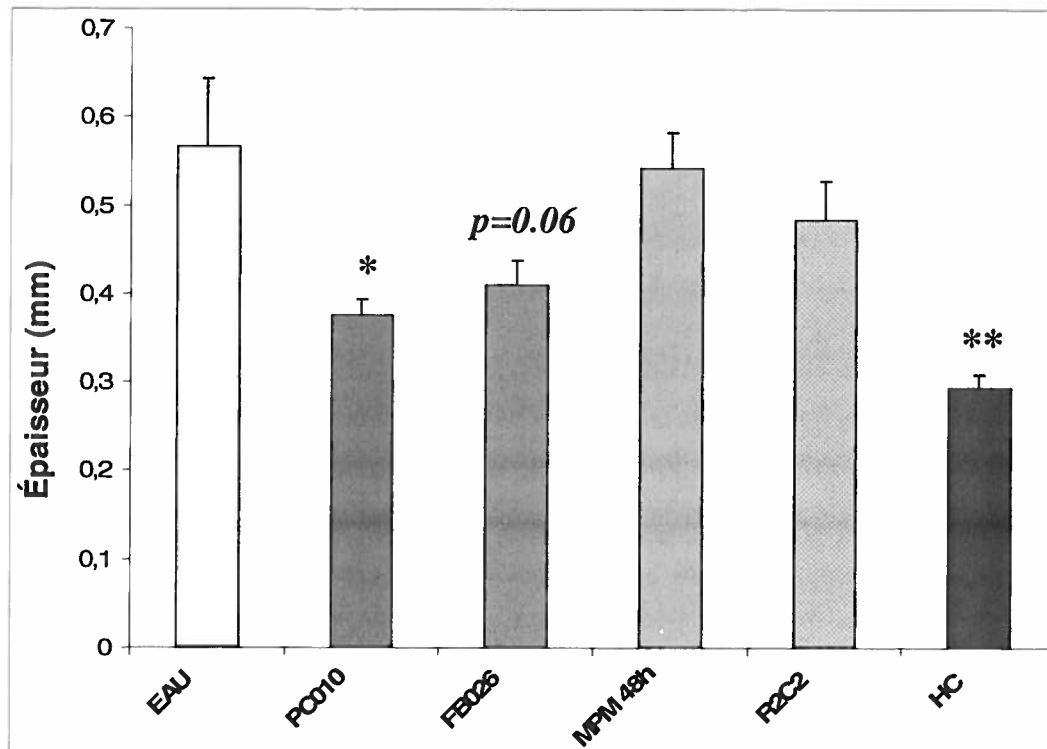


FIGURE 10. EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE DES DIFFÉRENTS PRODUITS DÉRIVÉS DE LA MPM DANS LE MODÈLE DE DERMATITE DE CONTACT.

L'évaluation des divers produits dérivés de la MPM dans le modèle de la dermatite de contact permet d'obtenir des indications sur les composantes de la MPM impliquées dans les effets anti-inflammatoires observés. Premièrement, la bactérie utilisée pour la fermentation ne semble pas, à elle seule, responsable de l'effet anti-inflammatoire observé. Par contre, un effet synergique est très certainement primordial pour les effets obtenus avec la MPM. Pour sa part, le temps de fermentation est important pour générer un produit possédant des effets anti-inflammatoires. Effectivement, lorsque la dégradation des protéines est très importante, comme c'est le cas pour la MPM fermentée pendant 48 heures, cet effet anti-inflammatoire associé à la MPM disparaît. Un temps de fermentation réduit, c'est-à-dire une fermentation de 12 heures (FB026), permet d'obtenir un certain effet anti-inflammatoire mais celui-ci est moins important que lors de la fermentation de 16 heures. Ces résultats seront discutés au chapitre 8.

7.3 Effet des MPM sur les fonctions macrophagiques

Afin d'évaluer l'effet de la consommation de MPM sur les fonctions de macrophages activés, les souris ont reçu une injection de protéose peptone 3% intra-péritonéale après 2 semaines de gavages à l'eau ou à la MPM. Les macrophages péritonéaux ont été recueillis 4 jours après l'injection, par lavage de la cavité péritonéale avec 10 ml de PBS. Ce modèle de péritonite a l'avantage d'activer majoritairement les macrophages et de créer une inflammation systémique légère. Ainsi, il est possible d'évaluer les effets de la MPM sur les fonctions macrophagiques lors d'une situation inflammatoire légère.

7.3.1 Phagocytose

La concentration de cellules isolées du péritoine suite à l'injection de protéose peptone a été ajustée à 2 millions de cellules par millilitre. La méthode d'évaluation du potentiel phagocytant des macrophages a été effectuée telle que décrite au chapitre 6. (Réf : Beaulieu, J. *et al.* 2007, **Inhibition of neutrophil**

infiltration by a malleable protein matrix of lactic acid bacteria-fermented whey proteins *in vivo*. *Inflammation Research*. (accepté pour publication juin 2007)).

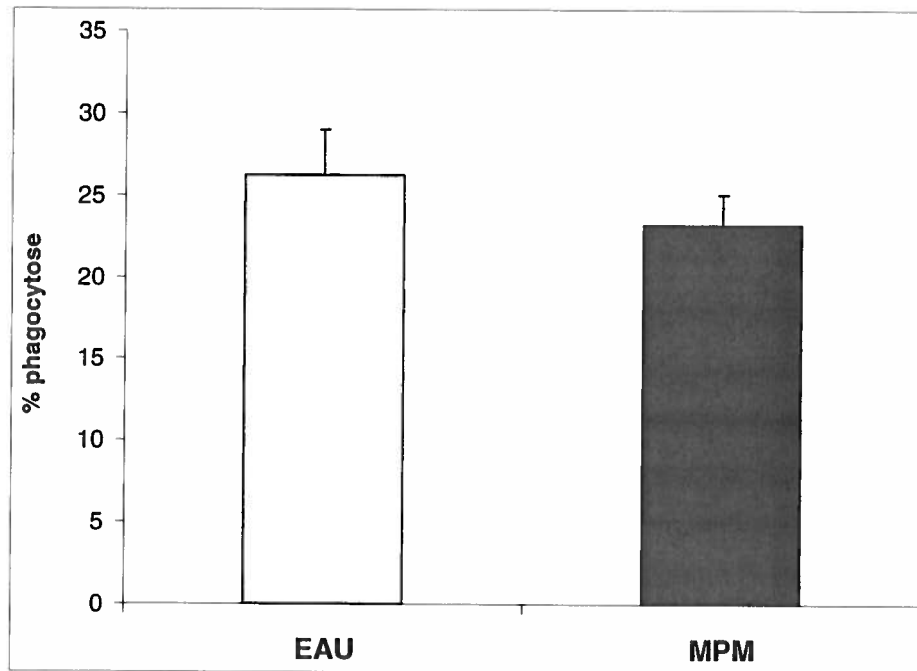


FIGURE 11. ÉVALUATION DU POTENTIEL PHAGOCYANT DES MACROPHAGES PÉRITONÉAUX ACTIVÉS À LA PROTÉOSE PEPTONE.

La consommation de MPM deux semaines avant le recrutement de macrophages péritonéaux suite à l'injection de protéose peptone 3% n'affecte pas le potentiel phagocytant de ces macrophages. La MPM ne possède donc pas d'effet sur le potentiel des macrophages à reconnaître et dégrader les particules rencontrées. Ce résultat sera plus amplement discuté au chapitre 8.

7.3.2 Apoptose

La concentration de cellules isolées du péritoine suite à l'injection de protéose peptone a été ajustée à 2 millions de cellules par millilitre. La méthode d'évaluation du degré d'apoptose des macrophages consiste à incuber les cellules

en présence du marqueur annexine V couplé à la FITC (fluorescein isothiocyanate) ainsi qu'avec un marqueur de mort cellulaire dans ce cas ci, l'iodure de propidium (PI), selon les recommandations du fabricant (*Stressgen, Victoria*). Lorsque les cellules deviennent apoptotiques, les molécules de phosphatidylsérine normalement à l'intérieur des membranes, deviennent exposées à la surface et peuvent ainsi être reconnues par l'annexine V. À l'opposé, lorsque les cellules laissent pénétrer le colorant PI, soit elles sont dans la dernière étape de l'apoptose ou déjà en mort cellulaire. L'évaluation des cellules exprimant soit l'annexine V-FITC ou le PI sont dénombrées par cytométrie de flux (*Epics XL Flow cytometry Coulter, Beckman Coulter*).

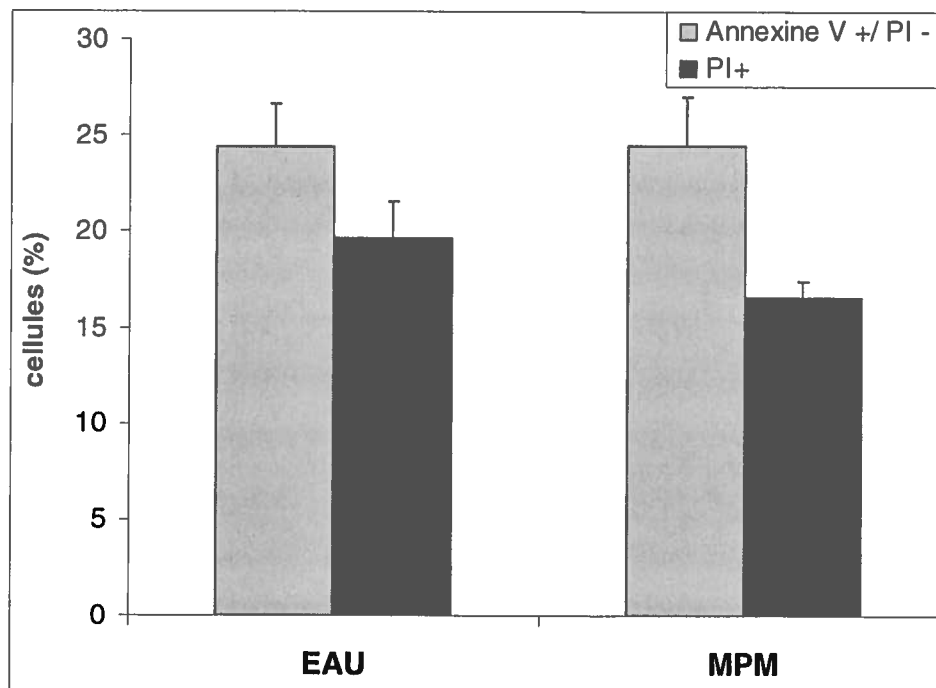


FIGURE 12. ÉVALUATION DU DEGRÉ D'APOPTOSE ET DE MORT CELLULAIRE DES MACROPHAGES PÉRITONÉAUX ACTIVÉS À LA PROTÉOSE PEPTONE.

La consommation de MPM n'affecte pas la degré d'apoptose ou de mort cellulaire des macrophages péritonéaux recrutés suite à l'activation à la protéose peptone 3%. La MPM ne possède donc pas d'effet sur la viabilité des macrophages ce qui ne peut expliquer l'effet anti-inflammatoire observé. Ces résultats seront plus amplement discutés au chapitre 8.

7.3.3 Production de ROS

La production de ROS chez les macrophages activés suite à l'injection de protéose peptone 3% a été évaluée par cytométrie en flux pour caractériser l'activité de la NADPH oxydase. La génération de H₂O₂ par la NADPH oxydase est quantifiée par la dégradation du 2',7'-dichlorofluorescéine diacétate (DCFH-DA) [482]. Brièvement, la concentration de cellules isolées du péritoine suite à l'injection de protéose peptone a été ajustée à 2 millions de cellules par millilitre. Dix microlitres de 2',7'-dichlorofluorescéine diacétate (DCFH-DA) a été ajoutés aux cellules et celles-ci sont incubées à 37 °C, 5% CO₂ durant 30 minutes. Par la suite, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS et resuspendues dans 500 µl de PBS. L'addition d'un micolitre de H₂O₂ sert de contrôle positif interne. La fluorescence est mesurée par cytométrie de flux (*Epics XL Flow cytometry Coulter, Beckman Coulter*). Les résultats sont exprimés en degré d'intensité de la fluorescence de la moyenne géométrique de la courbe de fluorescence.

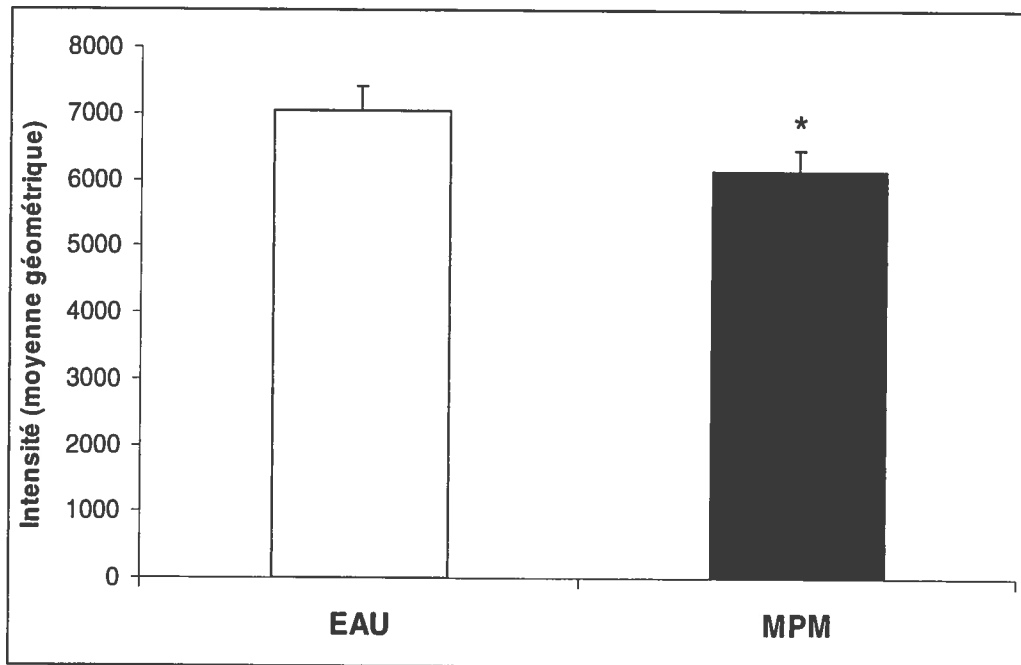


FIGURE 13. ÉVALUATION DE LA PRODUCTION DE H₂O₂ PAR LES MACROPHAGES PÉRITONÉAUX ACTIVÉS À LA PROTÉOSE PEPTONE.

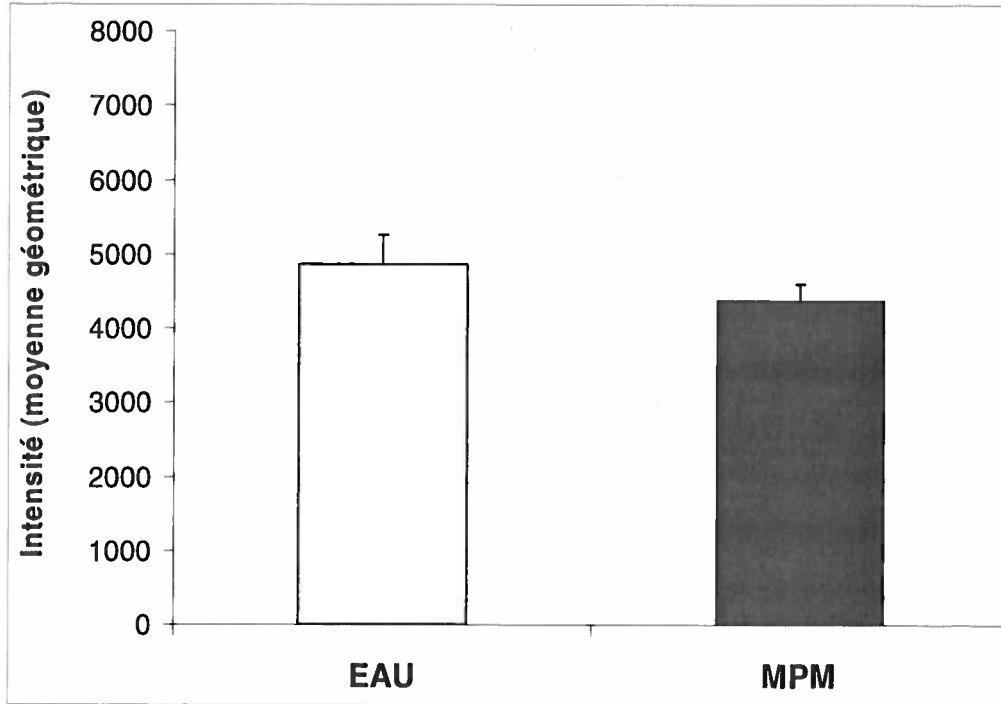


FIGURE 14. ÉVALUATION DE LA PRODUCTION DE H₂O₂ PAR LES MACROPHAGES PÉRITONÉAUX NON ACTIVÉS.

La production de ROS est la principale activité cytotoxique des macrophages. Cette méthode d'évaluation de la production de H₂O₂ par la NADPH oxydase est reconnue et utilisée depuis de nombreuses années [482-484]. La consommation de MPM diminue légèrement l'activité cytotoxique des macrophages activés permettant ainsi de limiter les dommages tissulaires causés par la génération de ROS lors d'une réaction inflammatoire. Cependant, l'évaluation de la production de H₂O₂ chez les macrophages péritonéaux non activés à la protéose peptone démontre que les niveaux de base de l'activité cytotoxique des macrophages via la NADPH oxydase ne sont pas affectés suggérant une inhibition partielle de l'activité cytotoxique seulement chez les macrophages activés lors d'une situation inflammatoire suite à la consommation de la MPM. Ces résultats seront plus amplement discutés au chapitre 8.

7.4 Régulation de la production de la cytokine IL-23

Afin d'évaluer l'effet de la consommation de MPM sur la production de la cytokine IL-23 en situation inflammatoire systémique, les souris ont reçu une injection de protéose peptone 3% intra-péritonéale. Les souris ont préalablement été gavées durant 2 semaines avant l'injection de protéose peptone et la rate a été prélevée 4 jours après l'injection. Les souris saines ont reçu une injection de PBS seulement. La production de la cytokine IL-23 a été mesurée par le service d'évaluation de la compagnie Endogen (Searchlight Multiplex ELISA). La méthode de préparation des échantillons et l'analyse de la cytokine ont été effectuées tel que décrit au chapitre 6. (Réf : Beaulieu, J. *et al.* 2007, **Inhibition of neutrophil infiltration by a malleable protein matrix of lactic acid bacteria-fermented whey proteins *in vivo*. *Inflammation Research*.** (accepté pour publication juin 2007)). Les résultats statistiques sont présentés avec les lettres (a,b,c); une différence significative entre les groupes est représenté par des lettres différentes.

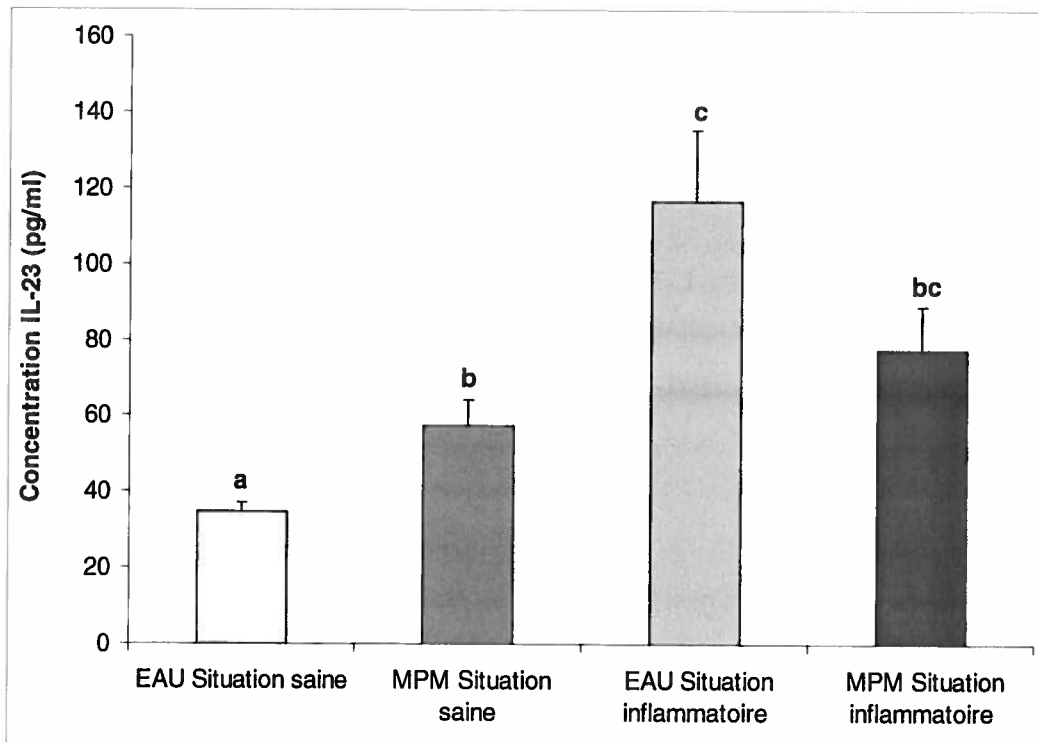


FIGURE 15. PRODUCTION DE LA CYTOKINE IL-23 DANS LA RATE DES SOURIS EN SITUATIONS SAINE ET INFLAMMATOIRE.

Il a précédemment été démontré que la MPM favorise la production de la cytokine IL-23 en situation saine indiquant un rôle de la cytokine IL-23 dans le mécanisme d'action de la MPM (Figure 3). Lors d'une situation inflammatoire légère (l'injection de protéose peptone 3% intrapéritonéale), il y a une augmentation systémique importante de la production de la cytokine IL-23 dans le groupe eau. Cependant, chez les animaux ayant consommés la MPM, cette augmentation est beaucoup moins importante. La production de IL-23 observée chez les animaux sains ayant consommés la MPM est similaire à celle observée chez les animaux en situation inflammatoire ayant consommés la MPM. Conséquemment, la MPM favorise l'augmentation de la production de IL-23 chez les animaux sains mais empêche une augmentation plus importante par la suite lors de la réaction inflammatoire. La MPM régule donc la production de la cytokine IL-23 chez les animaux sains et en situation inflammatoire suggérant un rôle important de cette cytokine dans le mécanisme d'action associé à la MPM. Ces résultats seront plus amplement discutés au chapitre 8.

CHAPITRE 8. DISCUSSION

La MPM, étant constituée essentiellement de composantes ayant démontré des effets immunomodulateurs, est un candidat de choix pour devenir un produit stimulant et/ou régulant le système immunitaire. La caractérisation de ses effets santé s'avère indispensable afin de développer un produit idéal pour le traitement de divers problèmes de santé. L'objectif de ce projet était d'évaluer le potentiel immunomodulateur et anti-inflammatoire de la MPM dans plusieurs modèles animaux. Les résultats ont été, pour la plupart, amplement discutés dans les divers articles scientifiques de cette thèse. Conséquemment, les éléments essentiels ainsi que des liens avec les nouveaux résultats permettant l'élaboration d'une hypothèse du mécanisme d'action seront discutés plus en détail.

Tel que discuté de façon exhaustive dans l'introduction, chacune des composantes de la MPM possède des effets sur le système immunitaire et ceux-ci sont très diversifiés et dépendent de nombreux facteurs dont le type de modèle animal utilisé. Il a été identifié, par exemple, que la lactoferrine stimule à la fois l'immunité innée [18, 20, 485] mais possède aussi des activités anti-inflammatoires tel que démontré dans de nombreux modèles animaux [22-24]. Il a également été rapporté que les différentes protéines de lactosérum et souches de probiotiques ne possèdent pas tous des effets identiques. Par conséquent, l'hypothèse du projet de doctorat est que la MPM possède des effets immunomodulateurs pouvant être très diversifiés dépendamment de la condition immunitaire ou état physiologique (sain ou inflammatoire) dans lequel se retrouve l'organisme. Le tableau 12 résume les résultats obtenus dans les divers modèles animaux afin de faciliter la lecture et la compréhension de cette discussion.

TABEAU 12. TABLEAU RÉSUMÉ DES RÉSULTATS OBTENUS DANS LES MODÈLES ANIMAUX PAR LA CONSOMMATION DE MPM.

MODÈLE	RÉSULTATS			INTERPRÉTATION
	AUGMENTATION	DIMINUTION	STABLE	
Animaux sains	<ul style="list-style-type: none"> ♦ PMN circulants ♦ GSH ♦ IL-18 ♦ IL-23 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ IL-12 ♦ IL-10 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Lymphocytes circulants ♦ Cellules T CD4+, T CD8+, T CD4+CD25+ (rate) ♦ Monocytes circulants ♦ Anticorps (Ac) totaux ♦ Ac spécifiques (MPM) ♦ IgE 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Stimulation des défenses naturelles. ♦ Pas effet sur le nombre de cellules T. ♦ Pas d'effet sur l'immunité humorale.
Dermatite de contact	<ul style="list-style-type: none"> ♦ PMN circulants ♦ Cellules T CD4+ (rate) 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ MPO oreille ♦ épaisseur oreille ♦ IL-1β, IL-6, IL-12, IL-18, TNFα 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Poids ♦ Lymphocytes circulants ♦ Cellules T CD8+ ♦ Cellules T CD4+CD25+ ♦ Poids rate ♦ IFNγ ♦ Expression génique TLR2 et TLR9 ♦ IL-2 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Effet anti-inflammatoire non associé à une IS. ♦ Augmentation des cellules T CD4+. ♦ Inhibition de la production de cytokines inflammatoires. ♦ Inhibition de l'infiltration leucocytaire.
« Air Pouch »		<ul style="list-style-type: none"> ♦ Leucocytes ♦ IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TNFα, IFNγ, GM-CSF ♦ MIP-1α, MIP-2, RANTES 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Phagocytose ♦ IL-2 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Inhibition de l'infiltration leucocytaire. ♦ Pas d'effet sur les fonctions cellulaires. ♦ Réduction de la production de cytokines et chimiokines.
Péritonite	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Production de ROS par les macrophages activés 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Empêche l'augmentation de IL-23 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Phagocytose ♦ Apoptose et mort cellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ Modulation des fonctions macrophagiques

IS : Immunosuppression

LE POTENTIEL IMMUNOMODULATEUR DE LA MPM

L'objectif premier du projet était d'évaluer le potentiel de la MPM à moduler le système immunitaire. Pour ce faire, l'utilisation d'animaux immunocompétents s'avérait indispensable afin d'évaluer globalement l'effet de la consommation de MPM sur l'immunité chez des individus exempt de pathologie. Tout d'abord, la MPM a démontré une stimulation de la production de PMN sanguins et de la production de GSH par les globules blancs circulants. Afin de s'assurer que les effets obtenus n'étaient pas une conséquence d'une réaction de l'organisme due à l'absence de consommation préalable de MPM par les animaux, la réaction immunitaire face à la MPM se devait d'être évaluée. Aucune production d'anticorps spécifiques à la MPM ne fut détectée ainsi que d'IgE suggérant une absence de réaction indésirable de l'organisme face à la consommation de MPM. L'absence de consommation préalable de MPM par les animaux aurait pu provoquer une réaction immunitaire contre la MPM mais la nourriture qu'ils consomment contient de 2-3% de protéines de lactosérum indiquant une consommation préalable assez importante de protéines de lactosérum par ces animaux (*Laboratory Rodent Diet 5001, Canadian Lab diet, Canada*). Par conséquent, une réaction indésirable de l'organisme aux protéines et peptides de lactosérum était peu probable.

L'augmentation des PMN sanguins et de la production de GSH, l'absence de stimulation d'anticorps et la modulation de la production de diverses cytokines suggèrent que la MPM agit, chez les individus sains, principalement en stimulant les défenses innées. La stimulation de la production de PMN sanguins pourrait démontrer que la MPM possède une défense naturelle plus importante contre les infections bactériennes et virales. Par ailleurs, il est connu que la production de GSH permet aux leucocytes une migration plus importante au site d'infection suggérant que la MPM pourrait favoriser une meilleure défense anti-infectieuse [486]. Cependant, ce modèle ne permet pas d'affirmer que les PMN auront une capacité supérieure à migrer vers un site d'infection. Le modèle de la poche d'air

a cependant démontré que la MPM inhibe fortement la migration des neutrophiles dans un tissu suite à un stimuli inflammatoire. Par contre, les résultats démontrent que la MPM possède des activités immunomodulatrices différentes lors d'une réaction inflammatoire qu'en situation saine. Il serait intéressant d'utiliser un modèle animal d'infection afin d'évaluer la migration des PMN dans un site d'infection et leur potentiel à effectuer la destruction pathogénique et ainsi, évaluer le potentiel de la MPM à véritablement stimuler les défenses innées.

La MPM stimule la production de GSH par les globules blancs suggérant que cette dernière, de part son rôle antioxydant, possède de nombreuses fonctions pour le développement d'un système immunitaire adéquat. L'effet antioxydant du GSH se traduit principalement par une neutralisation des oxydants produits naturellement par les leucocytes (ROS ou RNOS) ou ceux produits suite à un stress oxydatif [5]. Malgré le rôle important de la production de ROS lors d'une défense infectieuse, ces dérivés peuvent être très nocifs pour l'organisme et causer des dommages importants aux tissus environnants s'ils ne sont pas ensuite neutralisés. La MPM pourrait donc posséder une fonction importante dans la régulation d'une défense anti-infectieuse adéquate et ce, en permettant de limiter les dommages tissulaires caractéristiques d'une réaction inflammatoire.

Malgré la stimulation de l'immunité innée par la MPM, celle-ci peut également posséder un potentiel à stimuler l'immunité humorale. Par contre, l'absence de production d'anticorps totaux, de production des cytokines IL-4 et IL-5 ainsi que la diminution de la production de la cytokine IL-10 démontre que l'effet immunomodulateur de la MPM n'est pas associé à une stimulation de l'immunité humorale lorsque l'organisme est en condition immunitaire saine. Il serait intéressant d'évaluer le potentiel adjuvant de la MPM lors de l'administration d'un vaccin. Il est rapporté que les protéines de lactosérum favorisent le développement d'anticorps suite à une stimulation antigénique [10-13] suggérant que la MPM pourrait, dans ces conditions particulières, stimuler la production d'anticorps spécifiques et être ainsi utilisé comme adjuvant oral.

Le fait que la MPM est un produit de fermentation, il faut considérer ce qui est connu des interactions entre le système immunitaire et les probiotiques. Plusieurs études sur la consommation de différents probiotiques ont démontré une stimulation de la production des cellules T régulatrices produisant les cytokines IL-10 ou du TGF β [77, 79, 80]. Une étude de l'équipe de von der Weid a également démontré que la production de ces deux cytokines régulatrices était médiée par une population de cellules CD4+ qui permettait de contrôler les réactions immunitaires [78]. Or, les résultats démontrent que la modulation de l'immunité chez les animaux sains par la consommation de MPM n'est pas reliée à la production de la cytokine IL-10. Cependant, les cellules T régulatrices peuvent également réguler les fonctions immunitaires en agissant par contact cellule-cellule [406]. Conséquemment, malgré l'absence de production de IL-10, la production de cellules T CD4+CD25+, principale population de cellules T régulatrices, a aussi été évaluée. Les résultats démontrent que la MPM ne stimule pas la production de ces cellules T CD4+CD25+ dans la rate ou dans les plaques de Peyer. Par contre, il est connu que certaines cellules T possèdent le rôle de cellules T régulatrices mais n'expriment pas le marqueur membranaire CD25 [78, 303, 487]. L'évaluation des différentes populations lymphocytaires autant dans la rate que dans les plaques de Peyer démontre également que la MPM ne stimule pas la production des cellules T CD4+.

Les résultats démontrent la stimulation de l'immunité innée par la MPM, celle-ci pourrait également mener à la modulation des populations lymphocytaires importantes dans la défense adaptative. L'identification des populations lymphocytaires dans les plaques de Peyer avait comme objectif principal d'évaluer si la MPM stimule la production de cellules T dans l'intestin. La population de cellules T régulatrices impliquée dans la tolérance orale est produite principalement dans l'intestin et ces cellules possèdent un rôle de régulation, autant dans la tolérance orale que dans les maladies inflammatoires [406, 488]. L'absence de stimulation de la production de cellules T CD4+, T CD8+ ou T CD4+CD25+ démontre que non seulement la MPM ne favorise pas la

production de cellules T régulatrices dans l'intestin mais qu'elle n'a aucun effet sur la stimulation des populations de lymphocytes T effecteurs au niveau intestinal. Afin d'évaluer le potentiel de la MPM à stimuler l'immunité intestinale, il serait intéressant d'évaluer la modulation des autres populations leucocytaires ainsi que la production d'IgAs dans l'intestin. En effet, la MPM pourrait posséder des effets intéressants au niveau de l'immunité intestinale comme par exemple, une augmentation des défenses anti-infectieuses au niveau intestinal ou des effets anti-inflammatoires lors de maladies de l'intestin. Par ailleurs, l'absence de stimulation des cellules T CD4+, T CD8+ et T CD4+CD25+ dans la rate indique que la MPM ne stimule pas la production des cellules T effectrices ou des cellules T régulatrices au niveau systémique. La stimulation de l'immunité innée par la MPM n'est conséquemment pas reliée à la stimulation des cellules T régulatrices ou des cellules T effectrices.

Afin d'obtenir des indications concernant le mécanisme d'action de la MPM lors de la stimulation des défenses naturelles, la modulation de la production des cytokines a été évaluée. La réduction de la production de la cytokine IL-12 et l'absence de modulation des autres cytokines de la voie Th1 suggère que le mécanisme d'action ne serait pas relié à la stimulation de cette voie. Par ailleurs, la production de la cytokine IL-23 est considérablement augmentée par la consommation de MPM chez les animaux sains suggérant un rôle de cette cytokine dans le mécanisme d'action de la MPM.

LE POTENTIEL ANTI-INFLAMMATOIRE DE LA MPM

L'observation d'une stimulation des défenses innées de l'organisme par la MPM a ensuite menée à une question essentielle; c'est-à-dire de vérifier que les effets observés n'entraînent pas une réaction indésirable dans un contexte de maladie inflammatoire comme l'arthrite et les dermatites. Le modèle de la dermatite de contact a été adapté à nos études afin d'évaluer l'effet résultant de la MPM dans un modèle d'inflammation systémique facilement quantifiable. Ce

modèle a permis de démontrer que la MPM, malgré une stimulation des défenses naturelles chez les animaux immunocompétents, possède un effet anti-inflammatoire important comparable à celui d'un traitement à l'hydrocortisone oral et ne provoque pas une exacerbation de cette inflammation. La littérature démontre que certaines composantes de la MPM et en particulier, la lactoferrine et les probiotiques, peuvent posséder à la fois des effets immunomodulateurs et anti-inflammatoires [15, 17, 19, 25, 59, 71]. De plus, un effet de synergie est également susceptible de se créer entre les constituants dû à la présence dans ce produit de prébiotiques et nutriments reconnus pour protéger les bactéries lactiques de la dégradation [489, 490]. Cet effet de synergie peut également être dû à l'effet de protéolyse des bactéries lactiques ce qui génèrerait des peptides bioactifs [491-493]. Certains probiotiques démontrent des effets beaucoup plus importants lors d'une synergie avec des produits laitiers [2]. En réalité, l'action des micro-organismes durant la préparation d'aliments fermentés améliore la qualité, la quantité, la biodisponibilité ou la digestibilité des nutriments alimentaires [2]. Par exemple, la fermentation d'aliments avec des bactéries lactiques augmente la présence et la biodisponibilité de l'acide folique dans le lait, le yogourt et le kéfir [494-496]. La complexité de la MPM et un effet de synergie peut, en partie, expliquer les effets immunomodulateurs et anti-inflammatoires associés à la MPM.

Due à la complexité de sa composition, il a été envisagé que plusieurs mécanismes pourraient expliquer les observations obtenues. Tout d'abord, les résultats démontrent une inhibition importante de l'extravasation des neutrophiles dans les tissus dans le modèle de la dermatite de contact. Les différents résultats obtenus suggèrent que la MPM régule l'activité des neutrophiles. La consommation de MPM chez des individus sains favorise la production de PMN qui se retrouvent ensuite en circulation mais ne migrent pas nécessairement dans les tissus en situation inflammatoire. Dans le modèle de la dermatite de contact, il a également été démontré que les décomptes de PMN circulants étaient inversement proportionnels au degré d'inflammation. La myéloperoxidase

(MPO) est une enzyme majeure retrouvée essentiellement dans les granules des neutrophiles [251]. Conséquemment, l'évaluation de l'activité de cette enzyme permet d'obtenir une indication de la quantité de neutrophiles présents dans un tissu. L'évaluation de l'activité de la MPO dans les oreilles dans le modèle de dermatite de contact a démontré que l'activité de la MPO était moindre dans les oreilles des souris ayant consommé la MPM et l'hydrocortisone suggérant une inhibition de la migration des neutrophiles au site inflammatoire. Les glucocorticoïdes, dont l'hydrocortisone, sont connus pour inhiber l'extravasation des neutrophiles dans un tissu mais pas leur production [497]. Puisqu'il n'y a pas de corrélation exacte entre les deux méthodes quant aux nombres exactes de PMN dans le sang et de neutrophiles dans l'oreille, il devient par conséquent assez difficile d'évaluer si la MPM, selon ces paramètres, inhibe la production de neutrophiles par la moëlle osseuse dans ce modèle d'inflammation systémique. Par contre, il est évident qu'il y a une diminution de l'extravasation des neutrophiles dans l'oreille chez les animaux ayant consommés la MPM.

La MPM a également démontré une absence des effets secondaires similaires à ceux généralement rencontrés lors d'un traitement à l'hydrocortisone. La consommation de glucocorticoïdes inhibe la croissance chez les jeunes enfants et crée une immunosuppression importante caractérisée par une réduction marquée de la production lymphocytaire [498, 499]. Dans le modèle de la dermatite de contact, il y a arrêt de la croissance chez les souris ayant consommé l'hydrocortisone mais chez celles ayant consommé la MPM, la croissance s'est déroulée de façon normale suggérant que l'effet anti-inflammatoire de la MPM serait extrêmement profitable pour les jeunes enfants. De plus, une réduction de 50% des décomptes de lymphocytes circulants totaux et une réduction aussi importante du poids de la rate suite à la consommation d'hydrocortisone a été observée indiquant que les doses utilisées étaient effectives. Il y a une absence évidente de cette immunosuppression par la consommation de MPM suggérant un mécanisme d'action différent de celui des glucocorticoïdes et conséquemment, beaucoup plus favorable. Par contre, il a été démontré chez les souris que la dose

effective d'hydrocortisone est de 25 mg/kg [500] et que les doses nécessaires pour obtenir un effet anti-inflammatoire dans le modèle de la dermatite de contact doivent être très élevées [501]. Les résultats obtenus avec la MPM étaient très intéressants puisqu'ils se rapprochaient de ceux obtenus avec une dose très élevée d'hydrocortisone. Cependant, malgré que la MPM possède un effet anti-inflammatoire similaire à celui observé pour l'hydrocortisone à la dose utilisée, l'immunosuppression engendrée par l'hydrocortisone est très certainement exagérée sur ce qui existe réellement dans la population. Il serait intéressant de comparer les effets de doses plus faibles d'hydrocortisone avec ceux obtenus avec la MPM.

L'effet anti-inflammatoire observé nécessite des recherches quant à l'impact de la MPM sur les populations lymphocytaires impliquées dans ce modèle. L'amplification de l'inflammation dans le modèle de la dermatite de contact est médiée par les lymphocytes effecteurs T CD8+ qui migrent au site inflammatoire et favorisent le recrutement plus intense de neutrophiles et macrophages via la production de cytokines et plus particulièrement, l'IFN γ [348]. L'évaluation de la production de cellules T CD8+ dans la rate des souris dans la dermatite de contact démontre que la MPM n'affecte pas le développement de ces cellules effectrices tel qu'illustré par l'absence de modifications de la production de ces cellules par la consommation de la MPM. Les populations lymphocytaires dans la rate ont été évaluées 5 jours après la sensibilisation ce qui correspond à la période de temps nécessaire au développement de ces cellules effectrices dans la rate sans permettre une migration importante en périphérie [348]. Cependant, l'étape de l'élicitation sur l'oreille n'a pas été effectuée lors de cette étude afin de ne pas favoriser une migration plus importante et plus rapide des cellules de la rate vers la circulation sanguine et finalement, vers l'oreille. De plus, la production de la cytokine IFN γ n'est pas affectée par la consommation de MPM supportant l'hypothèse que la MPM n'agit pas via la modulation de la production des cellules T CD8+ effectrices.

Par ailleurs, les lymphocytes T CD4+ et T CD4+CD25+ possèdent un rôle de régulation important dans le modèle de la dermatite de contact [348, 502]. Tout comme pour l'évaluation des cellules T CD8+ décrit précédemment, les cellules T CD4+ et T CD4+CD25+ ont été évaluées dans la rate 5 jours après la sensibilisation. La MPM stimule la production des cellules T CD4+ dans la rate des souris dans la dermatite de contact ce qui peut expliquer la diminution de l'inflammation. Par contre, il est également connu que le mécanisme de régulation de la dermatite de contact par les cellules T CD4+ est relié à la production des cytokines IL-4 et IL-10 [353, 430]. Or, la MPM ne favorise pas la production de ces cytokines. Par conséquent, il a été envisagé que ces cellules puissent être des cellules T régulatrices CD4+CD25+ agissant via un mécanisme de régulation différent de celui de la production de cytokines régulatrices par exemple, via un contact cellule-cellule. Cependant, cette stimulation de la production des cellules CD4+ n'est pas associée à une stimulation de cellules T CD4+CD25+. Néanmoins, il est envisagé que ces cellules CD4+ puissent être des cellules T régulatrices CD4+CD25- ou des cellules T CD4+ effectrices permettant la régulation de l'inflammation via un mécanisme différent de la production des cytokines IL-4 et IL-10.

L'infiltration des leucocytes au site inflammatoire est une étape essentielle dans le développement et l'amplification de la pathologie. Comme il a été démontré dans le modèle de la dermatite de contact que l'inhibition de l'extravasation des neutrophiles semble impliquée dans l'effet anti-inflammatoire observé par la consommation de la MPM, le modèle de la poche d'air a été utilisé pour confirmer cette hypothèse. L'inhibition de l'extravasation des neutrophiles a été confirmée dans ce modèle où l'infiltration leucocytaire a été réduite de 50% chez les animaux ayant consommé la MPM avant l'injection de LPS. Par conséquent, la consommation de MPM semble fortement se traduire par une inhibition de l'infiltration leucocytaire en condition inflammatoire.

L'inhibition de l'infiltration des neutrophiles dans un tissu en situation inflammatoire a été bien démontré par les résultats dans les modèles de la dermatite de contact et de la poche d'air. Cependant, il est nécessaire d'évaluer les fonctions des neutrophiles dans le tissu malgré la diminution de l'extravasation afin d'obtenir des indications sur les effets de la MPM sur les activités de ces cellules. Une des caractéristiques principales des neutrophiles est leur capacité de phagocytose qui leur confère ce rôle de défense de l'organisme. La consommation de la MPM n'empêche pas les neutrophiles d'effectuer la phagocytose suggérant que les cellules présentes, même si elles sont en moins grand nombre, sont amplement capables de remplir leurs fonctions défensives. Ces résultats suggèrent que malgré le potentiel anti-inflammatoire de la MPM, les individus pourront encore combattre la présence d'un agent infectieux, ce qui n'est pas le cas notamment pour les individus consommant l'hydrocortisone [503-505]. Par contre, il devient important de confirmer que les PMN, dans ces conditions, pourront migrer au site d'infection et être efficaces.

COMPOSANTES DE LA MPM POUVANT EXPLIQUER LES EFFETS OBTENUS

Il a été rapporté dans la revue de littérature que chacune des composantes de la MPM peut être responsable des effets immunomodulateurs observés. Des études ont été réalisées dans l'objectif de démontrer que la synergie entre ces constituants est nécessaire pour obtenir un « alicament » possédant des effets immunomodulateurs optimaux et différents. Le modèle de la dermatite de contact était approprié pour comparer l'effet de différents produits dérivés de la MPM car ce modèle possède l'avantage de pouvoir quantifier précisément le degré d'inflammation et ainsi, permettre l'évaluation du potentiel anti-inflammatoire d'un dérivé par rapport à un autre. Ce modèle a permis de constater que l'effet anti-inflammatoire de la MPM n'est pas uniquement associé à la bactérie *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2 qui n'a démontré aucun effet anti-inflammatoire dans ce modèle animal. Par contre, les résultats démontrent que la fermentation d'une durée contrôlée avec ce probiotique est nécessaire pour

obtenir un effet anti-inflammatoire optimal. Effectivement, la fermentation à court (12 heures) ou moyen (16 heures) terme est nécessaire pour obtenir l'effet anti-inflammatoire observé. Ce temps de fermentation permet d'obtenir une protéolyse limitée sur les protéines de lactosérum. À l'opposé, lors d'une fermentation à long-terme (48 heures) où la protéolyse est supérieure, cet effet anti-inflammatoire disparaît. Ce résultat démontre qu'une fermentation prolongée où il y a génération de plusieurs peptides ne permet pas d'obtenir une matrice optimale pour les effets immunomodulateurs observés.

Lors de ce projet de recherche, il a été démontré que la MPM possède des effets immunostimulants et anti-inflammatoires. Ces découvertes suggèrent que la MPM a le potentiel de devenir un « alicament » unique dans la régulation de l'immunité. Il existe sur le marché quelques « alicaments » similaires à la MPM, soit de part leur composition ou de leur mode de production. Une comparaison des effets immunomodulateurs de ces produits avec la MPM s'avère nécessaire afin de démontrer le potentiel unique de régulation de l'immunité par la MPM. Le HMS90, un isolat de protéines de lactosérum, est reconnu pour posséder des effets antioxydants via la stimulation de la production de GSH [3]. Il favorise également la production de lymphocytes et la défense humorale [4]. Le produit HMS90 a été comparé avec la MPM lors des études chez les animaux sains et les résultats obtenus permettent de confirmer que la MPM possède des effets différents du HMS90. La MPM a démontré une stimulation de la production de GSH similaire au HMS90 mais une absence de production de lymphocytes et d'anticorps. Par contre, à l'opposé du HMS90, la MPM stimule également la production de PMN sanguin associée à la stimulation de l'immunité innée démontrant que malgré qu'elle possède des rôles similaires au HMS90, ces deux produits ont des effets immunomodulateurs différents et conséquemment, des applications différentes. La MPM est constituée de bactéries lactiques, ce qui n'est pas le cas pour la HMS90, pouvant expliquer ces différences observées dans les effets biologiques.

Le produit BioPure-GMP est un peptide, le glycomacropéptide, isolé du lactosérum suite à la production fromagère et qui possède des effets anti-inflammatoires intéressants dans un modèle d'inflammation intestinale [506]. Les auteurs ont envisagé que le mécanisme d'action de l'effet anti-inflammatoire de ce produit serait relié à l'inhibition de la voie NF- κ B due à une réduction de la production de iNOS et IL-1 β [506]. La présence de GMP dans la MPM n'a pas été démontré mais il est possible qu'elle soit présente en quantité plus faible que les doses utilisées dans la démonstration de l'effet anti-inflammatoire dans ce modèle d'inflammation intestinale. Par conséquent, il est envisagé que les résultats obtenus, soit la diminution de IL-1 β , puissent être associés à ce peptide. Cependant, le GMP ne peut être responsable de tous les effets observés puisqu'il a été démontré que ce produit, à l'opposé de la MPM, ne stimule pas la production de GSH [506]. La MPM permet donc, de part sa composition, d'obtenir des effets immunomodulateurs différents et plus variés que le produit BioPure-GMP.

Un autre produit très similaire à la MPM, le kéfir, est un lait fermenté avec différentes souches de lactobacilles, qui a démontré un potentiel de stimulation de l'immunité innée via la production de cytokines pro-inflammatoires ainsi que de la cytokine IL-10 [507] et de la production de IL-6 par les plaques de Peyer [507]. Le kéfir possède aussi des activités anti-tumorales associées à une diminution de la production de la cytokine IL-6 et une augmentation rapide de la production de TNF α et IFN γ suivie d'une diminution de la production de ces cytokines lorsque la tumeur est implantée [508]. Il a également été rapporté que le kéfir augmente la production de IL-10 et IL-4 qui est corrélée avec la diminution de TNF α et IFN γ indiquant que le mécanisme d'action est relié à la production de cytokines Th2 régulant la production des cytokines pro-inflammatoires [508]. Ces résultats démontrent que le mécanisme d'action de la stimulation de l'immunité qui permet d'obtenir des activités anti-tumorales est différent de celui de la MPM et donc, il serait intéressant de vérifier si la MPM possède des activités anti-tumorales malgré que le mécanisme d'action serait probablement différent.

Plusieurs yogourts et laits fermentés ont été développés et parmi ceux-ci, deux produits prennent une place considérable dans le marché des aliments fonctionnels stimulant les défenses immunitaires ou intestinales. Tout d'abord, le produit DanActive qui est un lait supplémenté avec la bactérie *Lactobacillus casei* DN-114. Ce produit a démontré une stimulation importante de la production de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF α et IFN γ ainsi qu'une diminution de la production de IL-10 indiquant une défense immunitaire exclusivement reliée à la stimulation de l'immunité [509]. Ce produit est très intéressant pour stimuler les défenses anti-infectieuses mais ne possède pas le même mécanisme d'action que la MPM qui possède en plus des effets anti-inflammatoires. Deuxièmement, le yogourt Activia, qui contient la bactérie *Bifidobacterium (animalis) lactis* ou *BL Regularis*^{MC}, a démontré des effets bénéfiques sur le tractus intestinal et diminue grandement les symptômes associés au syndrome du colon irritable [510, 511]. Cependant, les études n'ont pas démontré les effets de ce produit sur le système immunitaire.

Conséquemment, on peut avancer que la MPM possède des effets beaucoup plus diversifiés que ceux associés à divers produits similaires déjà présents sur le marché. La MPM est le seul de ces produits qui possèdent à la fois des effets immunostimulants et anti-inflammatoires. Les résultats de la MPM dans de nombreux modèles animaux en font un produit de choix parmi les « alicaments » disponibles sur le marché actuellement.

MÉCANISMES DE RÉGULATION POTENTIELS EXPLIQUANT LES EFFETS DE LA MPM

Plusieurs mécanismes sont connus pour leur rôle de régulation du système immunitaire et en particulier, des maladies inflammatoires. Parmi ceux pouvant expliquer les effets obtenus par la MPM notons, la modulation de l'expression des TLR, la stimulation des cellules T régulatrices, la modulation des fonctions des

leucocytes comme la phagocytose, l'apoptose et la production de ROS ainsi que la modulation de la production de cytokines.

La MPM, de part sa composition, pourrait être reconnue par divers TLR mais en particulier, le TLR9 dû à la présence de la bactérie *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2. Les bactéries lactiques, étant constituées de séquences d'oligonucléotides pouvant être reconnus par le TLR9, peuvent permettre la régulation des défenses immunitaires via la voie d'activation NF- κ B. En effet, il a été démontré que la reconnaissance d'oligonucléotides de bactéries lactiques par le TLR9 favorise une réponse immunitaire de type Th1 via la production de IL-12 et IFN γ [96]. À l'opposé, il est aussi connu que certaines souches de bactéries lactiques possèdent des effets anti-inflammatoires dans des modèles de colite ulcéreuse via la production d'IFN α suite à la reconnaissance d'oligonucléotides par le TLR9 qui conséquemment, mène à la production de cellules T régulatrices produisant de IL-4 ou de IL-10 [99, 477]. Malgré qu'il a été démontré que la bactérie R2C2 n'est pas à elle seule responsable des effets anti-inflammatoires observés avec la MPM, il est envisagé que le processus de fermentation et de récupération de la MPM puisse générer des fragments bactériens et la libération d'oligonucléotides bactériens. Ce mécanisme de régulation pourrait donc expliquer à la fois les effets immunomodulateurs et anti-inflammatoires observés. Cependant, chez les animaux sains, l'absence de production des cytokines de la voie Th1 ainsi que la diminution de IL-12 a été rapporté. Également, la MPM ne favorise pas la production de cellules T régulatrices produisant de IL-10 autant chez les animaux sains qu'en situation inflammatoire. Donc, tout porte à croire que la MPM n'agit pas via l'interaction des séquences d'oligonucléotides de la bactérie avec le TLR9. Certaines composantes de la MPM pourraient également interagir avec le TLR2, soit certains peptides et fragments bactériens qui sont cependant, encore inconnus jusqu'à ce jour. La reconnaissance de PAMP avec le TLR2 mène à la production de cytokines pro-inflammatoires de la voie NF- κ B soit IL-1, IL-12 et TNF α [169]. De plus, il est connu que les agonistes du TLR2 favorise

l'expansion et la survie des cellules T régulatrices CD4+CD25+ produisant de IL-10 [415]. Il n'est donc pas exclu que l'interaction de certaines composantes de la MPM puissent être des agonistes reconnus par le TLR2 pouvant ainsi expliquer certains effets immunomodulateurs observés. Cependant, la voie NF- κ B mène à la production de IL-12, IL-1 et TNF α et la diminution marquée de IL-12 observée dans tous les modèles animaux et l'absence d'effet sur les cytokines IL-1 et TNF α chez les animaux sains mettent en doute l'hypothèse que le mécanisme d'action est relié à la régulation de la voie NF- κ B. De plus, la MPM ne favorise pas la production de cellules T régulatrices et de la cytokine IL-10. Il semble donc que les composantes de la MPM n'interagissent pas avec le TLR2. L'expression génique des TLR2 et TLR9 a aussi été évaluée afin de vérifier si la MPM ne pourrait pas stimuler la différenciation de ces récepteurs dans les cellules immunitaires. Il y a absence autant de stimulation que d'inhibition de l'expression génique des TLR2 et TLR9 par la MPM indiquant qu'elle ne favorise pas le développement de ces récepteurs dans les cellules. À l'opposé, il est connu que l'hydrocortisone favorise l'expression de gènes associés à certains TLR, dont le TLR2 [512] ce que les résultats ont démontrés. Par contre, il serait intéressant d'évaluer dans ce contexte, la présence de ces récepteurs à la surface cellulaire.

Un autre mécanisme de régulation important des défenses immunitaires est la production de cellules T régulatrices. Il a été fortement envisagé que la MPM puisse favoriser la production de ce type de cellules immunitaires. Certains probiotiques exercent leur effet immunomodulateur via ce mécanisme d'action [77, 416]. Cependant, la MPM ne favorise pas la production de cellules T régulatrices de type CD4+CD25+ tel que démontré dans les organes des animaux sains et dans la dermatite de contact. Cependant, il y a augmentation significative de la production de cellules T CD4+ dans la dermatite de contact démontrant un rôle de ces cellules dans la régulation de la maladie dans ce modèle inflammatoire. Il est connu que les cellules CD4+ sont importantes dans la régulation de la dermatite de contact via la production de IL-4 et IL-10 [302,

303]. Par contre, la MPM a démontré aucun effet sur la production de ces cytokines indiquant que les cellules CD4⁺ produites n'agissent pas via la production de ces cytokines régulatrices. Il est suggéré que les cellules CD4⁺ produites par la MPM dans la dermatite de contact puissent posséder un rôle de régulation via un mécanisme contact cellule-cellule.

Par ailleurs, le rôle de la MPM dans les maladies inflammatoires pourrait également s'expliquer par une réduction importante des fonctions des leucocytes ce qui aurait pour conséquence, de limiter les dommages tissulaires et l'amplification de l'inflammation. Une caractéristique importante des cellules inflammatoires est leur capacité de phagocytose permettant ainsi l'élimination des pathogènes et des débris cellulaires lors de l'inflammation. Comme démontré dans le modèle de la poche d'air, la MPM malgré l'inhibition importante de l'infiltration des neutrophiles, n'affecte pas le potentiel phagocytant de ces cellules. La MPM a également démontré une absence d'effet sur l'activité phagocytante des macrophages péritonéaux suite à un stimulus, indiquant que ces cellules possèdent le potentiel d'agir aussi efficacement dans l'étape cruciale de résolution de l'inflammation. De plus, les macrophages activés possèdent une activité phagocytante accrue ce qui a comme conséquence majeure, une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires [263]. L'absence de stimulation de la phagocytose par la MPM indique une absence de stimulation accrue de ces cellules limitant ainsi la production de cytokines par ces cellules.

Une augmentation de l'apoptose ou de la mort cellulaire des macrophages aurait pu suggérer que la MPM diminue la viabilité des cellules et conséquemment, la réduction de leur présence, de leur survie et de leur activité dans une situation inflammatoire. Or, la MPM n'a démontré aucun effet soit de diminution ou d'augmentation de l'apoptose ou de la mort cellulaire indiquant que la MPM n'a aucun effet sur la viabilité des cellules inflammatoires.

L'activité cytotoxique majeure des macrophages est la destruction de corps étrangers via la production de ROS et RNOS. Cependant, cette production de ROS et RNOS cause également d'importants dommages lors d'une réaction inflammatoire [263]. Afin d'évaluer l'activité cytotoxique des macrophages, la production de H₂O₂ par les macrophages péritonéaux activés et non activés a été évaluée. L'activation des macrophages péritonéaux par l'injection de protéose peptone permet d'augmenter cette activité cytotoxique par les macrophages. Premièrement, l'activation des macrophages péritonéaux a effectivement permis l'augmentation de la production de H₂O₂. De plus, la MPM possède la capacité de diminuer légèrement cette activité cytotoxique par les macrophages en situation inflammatoire. L'effet inflammatoire de la MPM peut donc, en partie, s'expliquer par la diminution des dommages tissulaires causés par les macrophages. En contre partie, la MPM n'a aucun effet sur l'activité cytotoxique des macrophages péritonéaux non activés suggérant que cette activité de répression des fonctions macrophagiques ne survient que lors d'une situation inflammatoire. L'absence de réduction de l'activité cytotoxique des macrophages non activés et la légère inhibition de celle-ci en situation inflammatoire laisse présager que la MPM ne diminue pas l'efficacité de la défense immunitaire lors d'une infection. Cette inhibition de la production de ROS n'est qu'attribuée à des macrophages pleinement activés lors d'une situation inflammatoire.

Finalement, il est démontré que les bactéries lactiques et les protéines de lactosérum régulent les fonctions immunitaires via la modulation de la production de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires dans diverses conditions immunitaires [129]. La modulation de la production des diverses cytokines est un mécanisme de régulation certainement très impliqué dans le mécanisme d'action de la MPM et est discuté dans la section suivante.

MODULATION DE LA PRODUCTION DE CYTOKINES DANS LES MODÈLES ANIMAUX

Dans le modèle de la poche d'air, la production des cytokines et chimiokines a été évaluée dans l'exsudat recueilli suite à l'injection de LPS. Ces médiateurs sont, en grande partie, produits par les cellules résidentes constituant l'épithélium de la poche d'air; c'est-à-dire les macrophages et fibroblastes [356]. La majorité des cytokines présentes dans la poche d'air suite à l'injection de LPS sont produites par les cellules résidentes de la poche d'air dans l'objectif d'attirer les neutrophiles au site inflammatoire. La MPM semble diminuer la production de cytokines et chimiokines par les macrophages et fibroblastes constituant l'épithélium, dû à la diminution de TNF α et de chimiokines, premiers médiateurs produits par ces cellules pour attirer les neutrophiles [513, 514]. Cependant, il est également suggéré que la MPM puisse affecter cet épithélium via la réduction du nombre de cellules expliquant cette diminution des médiateurs plutôt qu'une diminution de la capacité de production par ces cellules. Toutes les cytokines et chimiokines évaluées, à l'exception de IL-2, sont fortement inhibées suite à la consommation de la MPM dans le modèle de la poche d'air. Le rôle de ces médiateurs est de favoriser l'extravasation des leucocytes dans la poche d'air [361, 513]. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'extravasation des neutrophiles dans le site inflammatoire est due à une diminution de la production de ces médiateurs. Par contre, l'absence d'inhibition de production de IL-2 indique que les cellules résidentes dans l'épithélium ne sont pas inexistantes ou complètement inhibées et que la MPM n'agit pas en créant une immunosuppression.

Dans le modèle de la dermatite de contact, les cytokines pro-inflammatoires TNF α , IL-1 β , et IL-6 produites par les cellules de Langerhans et les kératinocytes suite à l'exposition à l'haptène, sont fortement inhibées (près de 50%) par la consommation de MPM. Ces cytokines ainsi que IL-12, étant également inhibée par la MPM, ont comme rôle principal de permettre la différenciation des cellules effectrices CD8+ [348]. Par conséquent, il est

envisagé que la MPM peut réduire la production de ces cellules effectrices CD8+. Cependant, ces cellules CD8+ produisent ensuite essentiellement la cytokine IFN γ qui permet une plus grande attraction de cellules inflammatoires dans le derme [347]. Or, la MPM a démontré aucune inhibition de la production d'IFN γ ainsi que de la production des cellules CD8+ dans la rate suggérant que l'effet anti-inflammatoire de la MPM dans la dermatite de contact n'est pas associé à une diminution de la production de ces cellules CD8+ malgré la diminution des cytokines IL-1 β , IL-6 et TNF α . De plus, il faut aussi mentionner que les cellules CD4+ possèdent un rôle régulateur via la production des cytokines de la voie Th2 et plus particulièrement, IL-4 et IL-10 [346, 354]. Il a également été rapporté qu'un lait fermenté par *Lactobacillus casei* possède un rôle anti-inflammatoire médié par les cellules CD4+ dans le modèle de dermatite de contact [71]. Par conséquent, la MPM pourrait agir selon un mécanisme de régulation similaire. L'évaluation des cytokines IL-4 et IL-10 démontre cependant que la MPM agit différemment et que la production des cytokines de la voie Th2 régulant cette maladie n'est pas impliquée dans l'effet obtenu par la consommation de la MPM puisque ces deux cytokines sont également inhibées par la consommation de la MPM. La MPM stimule plutôt la production des cellules CD4+CD25- indiquant que ces cellules peuvent être impliquées dans le mécanisme d'action de la MPM via une régulation non médiée par les cytokines IL-4 et IL-10.

D'autre part, la production de IL-2 n'est pas affectée par la consommation de MPM dans le modèle de la dermatite de contact. Dans le modèle de la poche d'air, IL-2 est la seule des cytokines évaluées dont la production a été maintenue par la consommation de MPM. Le potentiel antioxydant de la MPM pourrait en partie, expliquer ces résultats concernant l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires ainsi que le maintien de la production de IL-2. Il a été rapporté que le GSH active les cellules NK et les réponses lymphocytaires via la production de IL-2 mais possède également des effets anti-inflammatoires [515-518]. Comme la production de la cytokine IL-2 n'est pas affectée, les

résultats suggèrent que cette cytokine possède un rôle important dans les effets immunomodulateurs de la MPM. Le rôle de IL-2 est principalement de permettre le développement d'une réaction lymphocytaire [519, 520] indiquant qu'une sous-population de lymphocytes pourrait être impliquée dans les effets obtenus avec la MPM. La cytokine IL-2 permet la prolifération des cellules T pouvant ainsi, expliquer qu'il n'y ait aucune inhibition des cellules T CD8+ dans le modèle de dermatite et également, augmentation de la production de cellules T CD4+ dans ce modèle. De plus, les cellules CD8+ produisent de IL-2 nécessaire à la production de cellules régulatrices CD4+ contrôlant ensuite, les fonctions des cellules T CD8+ dans le modèle de la dermatite de contact [502]. Ce mécanisme d'autorégulation par les cellules CD8+ dans le modèle de la dermatite de contact pourrait être amplifié ou accéléré par la consommation de MPM. Le mécanisme d'action semble donc, en partie, reliée à la production de la cytokine IL-2 qui pourrait favoriser ensuite, la production de cellules CD4+ régulant l'inflammation dans la dermatite de contact.

L'évaluation de la production de cytokines chez des animaux immunocompétents a permis d'évaluer de façon systémique l'impact de la MPM sur le système immunitaire et ainsi, d'obtenir des indications afin de comprendre le mécanisme d'action lui conférant à la fois un rôle immunostimulant et anti-inflammatoire. La production des cytokines impliquées dans le développement des anticorps, c'est-à-dire IL-4 et IL-5, n'est pas stimulée suite à l'administration de MPM confirmant ainsi, l'absence de production d'anticorps préalablement observée chez les animaux sains. Par ailleurs, une diminution de la production de IL-10 est observée et mais la MPM en situation immunitaire saine ne semble pas favoriser la production de cellules T régulatrices. La production des diverses cytokines laissent croire à un mécanisme de stimulation de l'immunité différent de celui de la voie Th1 puisque une diminution importante de la production de la cytokine IL-12 ainsi, qu'une absence de modulation de l'IFN γ est démontrée. À la lumière de ces résultats, il est possible d'envisager une autre voie de

stimulation de l'immunité; voie qui aurait un rôle important à jouer dans la différenciation des PMN.

Les cytokines IL-1 β , IL-6 et TNF α , généralement produites par les macrophages et fortement associées à une réaction inflammatoire, sont diminuées par la consommation de MPM comme démontré dans la dermatite de contact et du modèle de la poche d'air. Ces cytokines ont aussi été associées à une plus grande perméabilité vasculaire permettant l'extravasation des cellules inflammatoires [521, 522]. Leur diminution par la consommation de la MPM peut expliquer en partie, la réduction de l'infiltration cellulaire observée dans ces deux modèles. Par contre, la cytokine IFN γ primordiale pour l'amplification de l'inflammation dans la dermatite de contact, n'est pas inhibée suggérant également un mécanisme d'action différent d'une inhibition de la voie Th1 classique.

Un des points marquants est la production de la cytokine IL-23 chez les animaux sains qui augmente suite à la consommation de la MPM. En contre partie, lors de la stimulation à la protéose peptone qui active les macrophages péritonéaux, une augmentation importante de cette cytokine chez les animaux n'ayant pas reçu préalablement la MPM a été démontré. À l'opposé, cette augmentation de la production de la cytokine IL-23 chez les animaux ayant consommés la MPM est inhibée. Il semble donc, que la consommation préalable de MPM chez les animaux sains favorise un seuil de production de la cytokine IL-23 qui par la suite, n'augmente pas lors de l'inflammation. Chez des animaux pré-traités avec la MPM, l'augmentation de la production de IL-23 associée à un état inflammatoire est absente comparativement à des animaux non-traités. La régulation de la production de IL-23 semble donc importante dans le mécanisme d'action de la MPM autant chez les animaux sains qu'en situation inflammatoire.

MÉCANISME(S) D'ACTION POTENTIEL(S) DE LA MPM

Les résultats obtenus démontrent que la modulation de la production de la cytokine IL-23 chez les animaux sains et en conditions inflammatoires est impliquée dans le mécanisme d'action de la MPM. L'augmentation importante de la production de la cytokine IL-23 corrélée avec l'augmentation des PMN circulants suggère que la cytokine IL-23 est impliquée dans la stimulation de la granulopoïèse observée chez les animaux sains. Les résultats indiquent que la stimulation de l'immunité innée n'est pas reliée à une stimulation de la voie Th1 car il y a diminution importante de la cytokine IL-12. De plus, malgré l'augmentation de la production de la cytokine IL-18, la diminution marquée de la production de IL-12 corrélée avec l'absence de modulation de l'IFN γ montre bien que la MPM ne stimule pas la voie immunitaire Th1. L'augmentation concomitante de la production des cytokines IL-18 et IL-23 suggère leur rôle dans le mécanisme d'action de l'effet immunostimulant de la MPM.

En situation inflammatoire, la MPM empêche l'augmentation subséquente de la production de IL-23 suggérant que la modulation de la production de cette cytokine est également impliquée dans le mécanisme d'action de la MPM en conditions inflammatoires. À l'opposé, la MPM lorsque consommée par des animaux sains, permet l'augmentation de la production de IL-23 afin de stimuler les défenses infectieuses. Par contre, chez des animaux en conditions inflammatoires ayant consommés préalablement la MPM, les niveaux de IL-23 sont similaires à ceux des animaux sains traités à la MPM. Cette dernière favoriserait donc un niveau seuil de production de IL-23 qui n'augmente pas suite à un stimulus inflammatoire. Ce résultat suggère que la MPM, malgré ces effets anti-inflammatoires, ne causerait pas de risque supplémentaire de développer une infection dû à ce niveau seuil d'activation de l'immunité.

Par ailleurs, dans le modèle de dermatite de contact, la MPM provoque une réduction importante de la production des cytokines IL-1 β , IL-6 et TNF α . Par

contre, la production d'IFN γ n'est pas réduite par la consommation de MPM démontrant que l'inhibition des cellules de la voie Th1, cellules importantes dans la génération et l'amplification de l'inflammation dans ce modèle, ne semble pas être impliquée dans le mécanisme d'action de l'effet anti-inflammatoire de la MPM. De plus, il est connu que l'inhibition de l'IFN γ ne favorise pas la réduction des cytokines pro-inflammatoires IL-1 et IL-6 et n'affecterait pas l'infiltration leucocytaire dans la dermatite de contact [465]. Les cytokines TNF α , IL-1 β et IL-6 ont aussi démontré des rôles essentiels dans l'extravasation des neutrophiles [523, 524] et conséquemment, la diminution indirecte de la production de ces cytokines pourrait expliquer la diminution importante de l'infiltration cellulaire observée par la consommation de MPM dans les modèles animaux d'inflammation.

Il a récemment été démontré que la cytokine IL-23 est impliquée dans la modulation d'une nouvelle sous-population de lymphocytes, les cellules Th17 [454, 455, 525-528]. Il était spéculé depuis plusieurs années qu'une sous-population de cellules T contrôlait la production et l'activité des neutrophiles [452]. Ces cellules T, qui sont différentes des cellules Th1 ou Th2, produisent de IL-17 suite à l'activation par IL-23, d'où l'appellation Th17 [454, 455, 529]. Les cellules Th17 possèdent un rôle autant dans l'immunité innée via la stimulation des réponses dépendantes des granulocytes que dans les réponses inflammatoires [457]. En effet, les cellules Th17 sont activées par la production de IL-23 et sécrètent ensuite la cytokine IL-17A qui favorise la granulopoïèse via la production de G-CSF et GM-CSF [460]. L'augmentation de la production de la cytokine IL-18 favorise également le développement et la survie des cellules Th17 ainsi que la production accrue de IL-17A [530]. D'un autre côté, les cellules Th17 sont impliquées dans le développement de nombreuses pathologies inflammatoires dont, l'arthrite [469-472], la dermatite [465], les maladies inflammatoires de l'intestin [473-475], le diabète [463, 464] et le psoriasis [466-468]. He *et al.* ont démontré que des cellules CD8 $^{+}$ -produisant IL-17 sont distinctes des cellules CD8 $^{+}$ -produisant IFN γ et possèdent des fonctions

effectrices dans la phase d'élicitation de la dermatite de contact [465]. Il a également été rapporté que la réaction d'hypersensibilité associée à la dermatite de contact est considérablement réduite chez les souris déficiente en IL-17 démontrant ainsi leur rôle essentiel dans cette pathologie [531]. La production de IL-17 semble être essentielle dans l'amplification de la maladie en favorisant la production des cytokines inflammatoires IL-1 α , IL-1 β , IL-6 et KC [461, 532-534]. Cette étude a également rapporté que la production de ces cellules Th17 est favorisée par la présence de la cytokine IL-23 et que ces mêmes cellules sont responsables de l'infiltration des granulocytes au site inflammatoire [465]. De plus, la cytokine IL-2 possède un rôle important dans la régulation des cellules Th17 en interférant avec l'expansion et la survie des cellules Th17 et en inhibant la production de IL-17 chez les cellules Th17 différenciées [535].

Chez les animaux immunocompétents, les résultats démontrent que la MPM, via la production des cytokines IL-23 et IL-18, pourrait stimuler la production des cellules Th17. L'augmentation de la production de PMN circulants observée par la consommation de MPM peut s'expliquer par la stimulation importante de la production de la cytokine IL-23 qui favorise la production de cellules Th17. Tel que mentionné précédemment, les cellules Th17 favorisent la granulopoïèse via la production de G-CSF et GM-CSF [458, 459]. À l'opposé, la MPM en contexte inflammatoire agirait plutôt en inhibant la production subséquente de cellules Th17 suite à un stimulus inflammatoire et donc, par le fait même, en limitant la granulopoïèse des neutrophiles et la production de diverses cytokines pro-inflammatoires. En limitant l'augmentation de la production de IL-23 en situation inflammatoire, la MPM inhiberait la survie des cellules Th17. Cette hypothèse expliquerait bien la diminution importante de l'extravasation des neutrophiles ainsi que la diminution des cytokines IL-1 β , IL-6 et TNF α suite à la consommation de MPM. La production de la cytokine IL-18 est diminuée par la consommation de MPM dans la dermatite de contact. Comme la cytokine IL-18 pourrait avoir un rôle dans la différenciation des cellules Th17 lorsqu'en combinaison avec IL-23 [530], cette diminution de IL-18 dans la

dermatite de contact supporte également l'hypothèse de l'inhibition de la production des cellules Th17. Par ailleurs, il a été envisagé que la cytokine IL-2 serait très importante dans le mécanisme d'action de l'effet anti-inflammatoire de la MPM puisque dans les modèles de la dermatite de contact et de la poche d'air, la production de cette cytokine était, à l'opposé des autres cytokines testées, maintenue. Il est envisagé que IL-2 joue un rôle prédominant dans l'inhibition des réactions inflammatoires et les effets inhibiteurs de cette cytokine pourraient expliquer l'effet anti-inflammatoire observé. La production de IL-2 lors d'une situation inflammatoire pourrait ainsi permettre la régulation négative de la boucle de production et d'activation des cellules Th17 préalablement activées par la consommation de MPM.

Due à la complexité de sa composition, plus d'un mécanisme d'action pourrait être impliqué dans l'effet anti-inflammatoire obtenu par la MPM. La production des cellules CD4+ dans la dermatite de contact est stimulée par la consommation de MPM. De plus, l'absence de production des cytokines IL-4 et IL-10 démontre que ces cellules ne sont pas des cellules Th2 CD4+. Il est connu que les cellules Th2 CD4+ sont les cellules impliquées dans la régulation de la dermatite de contact [536]. Par contre, il a également été rapporté qu'une population de cellules CD4+ possède la capacité de réguler le développement de cellules CD4+ et CD8+ spécifiques via un mécanisme indépendant de la production de cytokines IL-4 et IL-10 [502]. De plus, la production de IL-2 est importante dans le développement de cette sous-population de cellules CD4+ [502]. En effet, il est démontré que IL-2 n'est pas nécessaire au développement des cellules CD4+ et CD8+ spécifiques à l'haptène mais joue un rôle essentiel dans la régulation du développement de ces cellules [502]. IL-2 est nécessaire pour maintenir la présence et l'activité des cellules CD4+ non-spécifiques qui diminuent le développement de cellules CD8+ effectrices dans la dermatite de contact [502]. Les résultats démontrent que le mécanisme d'action de la MPM pourrait également être relié à la production de IL-2 qui conséquemment, mènerait à la production de cellules CD4+ régulant la pathologie.

Chapitre 9. Conclusions et Perspectives

L'objectif du projet de recherche était d'évaluer le potentiel de la MPM à être utilisé comme « alicament » dans la stimulation de l'immunité et dans les maladies inflammatoires.

Ces recherches ont permis de démontrer que :

✧ La MPM stimule l'immunité naturelle via :

- ◆ Augmentation de la concentration de PMN sanguins
- ◆ Stimulation de l'activité antioxydante via la production de GSH
- ◆ Augmentation de la production systémique des cytokines IL-23 et IL-18
- ◆ Inhibition de la production des cytokines IL-12 et IL-10

◇ Mécanisme d'action envisagé: stimulation de la production de IL-23 favorisant une réponse immune dépendante des granulocytes.

✧ La MPM possède des effets-anti-inflammatoires via :

- ◆ Diminution de l'inflammation (épaisseur de l'oreille dans la dermatite) non associée à une immunosuppression
- ◆ Réduction importante de l'infiltration leucocytaire, principalement des neutrophiles (50% dans la poche d'air)
- ◆ Inhibition importante des cytokines et chimiokines dans un site inflammatoire (poche d'air)
- ◆ Inhibition systémique importante des cytokines pro-inflammatoires IL-12, IL-18, TNF α , IL-1 β et IL-6
- ◆ Aucune inhibition de IFN γ , cytokine importante de la voie Th1.
- ◆ Maintien la production de la cytokine IL-2
- ◆ Augmentation de la production de cellules CD4+ dans la dermatite de contact
- ◆ Inhibition de la production subséquente de IL-23 suite à un stimulus inflammatoire

◇ Mécanisme(s) d'action envisagé(s): *i*) modulation de la production de la cytokine IL-23 limitant le développement et l'amplification des maladies inflammatoires et autoimmunes. *ii*) augmentation de la production de cellules CD4+ régulant l'inflammation par un mécanisme indépendant de la production de cytokines régulatrices.

PERSPECTIVES

La priorité pour la poursuite de ce projet de recherche est de confirmer les hypothèses de mécanisme(s) d'action de la MPM. Dans l'éventualité où la stimulation de la production de la cytokine IL-23 observée chez les animaux sains permettrait la modulation subséquente des cellules Th17, il devient primordial de s'intéresser aux bienfaits de la MPM à stimuler les défenses contre les infections virales et bactériennes créant ainsi un « alicament » essentiel pour la stimulation de l'organisme. Par ailleurs, comme la MPM a démontré une inhibition subséquente de la cytokine IL-23 lors d'un stimulus inflammatoire, la confirmation que la MPM possède la capacité de limiter la production et les fonctions des cellules Th17 suite à un stress inflammatoire permettrait de démontrer que la MPM peut non seulement stimuler les défenses immunitaires mais également limiter les maladies inflammatoires.

Les résultats obtenus dans ce projet de recherche sont très prometteurs pour l'utilisation de la MPM comme « alicament » dans les défenses anti-infectieuses mais également dans de nombreuses pathologies autoimmunes dont, l'arthrite, le psoriasis, le diabète et les maladies inflammatoires de l'intestin. Effectivement, il est maintenant connu que la cytokine IL-23, via l'activation des cellules Th17, possède un rôle majeur dans la plupart des maladies autoimmunes et même, que ces cellules sont responsables du développement de ces maladies. Conséquemment, la modulation de la production de cette cytokine par la consommation de MPM permettrait non seulement d'apporter les bienfaits de la

stimulation de l'immunité innée mais également, de limiter le développement de maladies autoimmunes.

L'arthrite devient une pathologie de choix pour l'étude des effets de la MPM. La poche d'air est un modèle où il y a création d'une couche constituée de macrophages et fibroblastes morphologiquement similaire à celle de la membrane synoviale et par conséquent, représente bien les mécanismes impliqués dans les maladies arthritiques. Or, la MPM inhibe très fortement la production de cytokines et chimiokines impliquées dans le recrutement leucocytaires résultant effectivement en une réduction de 50% de l'infiltration cellulaire. Ces résultats obtenus sont fort prometteurs pour la réduction de l'inflammation et des douleurs associés à l'arthrite. Par ailleurs, la démonstration que la MPM stimule les cellules responsables de réguler la dermatite de contact suggère que celle-ci favorise également la production de cellules permettant de limiter les maladies inflammatoires via un mécanisme indépendant de la production de cytokines régulatrices. De plus, les résultats obtenus dans le modèle de la dermatite de contact suggèrent que la MPM possède des bienfaits dans cette pathologie et que des études cliniques chez l'humain souffrant de ce type de dermatite pourraient être envisagées à très court terme.

En conclusion, la MPM possède des activités immunomodulatrices et anti-inflammatoires intéressantes dépendamment des conditions immunitaires de l'organisme confirmant l'hypothèse initiale du projet de recherche. Ces études apportent de nouvelles connaissances très importantes quant aux mécanismes d'action potentiel d'un produit nutraceutique telle que la MPM. En effet, la modulation de la production de la cytokine IL-23 n'a encore jamais été associée à un produit nutraceutique, ce qui démontre le potentiel unique de la MPM à devenir un « alicament » important pour stimuler les défenses naturelles mais également, pour limiter le développement et l'amplification de nombreuses maladies inflammatoires et autoimmunes.

Bibliographie

1. Simard, E., et al., *Malleable protein matrix and uses thereof*. United States Patent #60/341., 2001.
2. Kopp-Hoolohan, L., *Prophylactic and therapeutics uses of probiotics : a review*. Journal of american diet association, 2001. **101**: p. 229-238.
3. Bounous, G. and P. Gold, *The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione*. Clin Invest Med, 1991. **14**(4): p. 296-309.
4. Bounous, G., G. Batist, and P. Gold, *Immunoenhancing property of dietary whey protein in mice: role of glutathione*. Clin Invest Med, 1989. **12**(3): p. 154-161.
5. Bounous, G. and J.H. Molson, *The antioxidant system*. Anticancer Res, 2003. **23**(2B): p. 1411-1415.
6. See, D., S. Mason, and R. Roshan, *Increased tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and natural killer cell (NK) function using an integrative approach in late stage cancers*. Immunol Invest, 2002. **31**(2): p. 137-53.
7. Kennedy, R.S., et al., *The use of a whey protein concentrate in the treatment of patients with metastatic carcinoma: a phase I-II clinical study*. Anticancer Res, 1995. **15**(6B): p. 2643-9.
8. Micke, P., K.M. Beeh, and R. Buhl, *Effects of long-term supplementation with whey proteins on plasma glutathione levels of HIV-infected patients*. Eur J Nutr, 2002. **41**(1): p. 12-8.
9. Moreno, Y.F., et al., *Features of whey protein concentrate supplementation in children with rapidly progressive HIV infection*. J Trop Pediatr, 2006. **52**(1): p. 34-8.
10. Wong, C.W. and D.L. Watson, *Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice*. J Dairy Res, 1995. **62**(2): p. 359-368.
11. Bounous, G. and P.A. Kongshavn, *Differential effect of dietary protein type on the B-cell and T-cell immune responses in mice*. J Nutr, 1985. **115**(11): p. 1403-1408.
12. Bounous, G., P.A. Kongshavn, and P. Gold, *The immunoenhancing property of dietary whey protein concentrate*. Clin Invest Med, 1988. **11**(4): p. 271-278.
13. Low, P.P.L., et al., *Effect of dietary whey protein concentrate on primary and secondary antibody responses in immunized BALB/c mice*. International Immunopharmacology, 2003. **3**(3): p. 393-401.
14. Lothian, J.B., V. Grey, and L.C. Lands, *Effect of whey protein to modulate immune response in children with atopic asthma*. Int J Food Sci Nutr, 2006. **57**(3-4): p. 204-11.
15. Miyauchi, H., et al., *Bovine lactoferrin stimulates the phagocytic activity of human neutrophils: identification of its active domain*. Cell Immunol, 1998. **187**(1): p. 34-37.
16. Wong, C.W., et al., *Effects of purified bovine whey factors on cellular immune functions in ruminants*. Vet Immunol Immunopathol, 1997. **56**(1-2): p. 85-96.
17. Shinoda, I., et al., *Effects of lactoferrin and lactoferricin on the release of interleukin 8 from human polymorphonuclear leukocytes*. Biosci Biotechnol Biochem, 1996. **60**(3): p. 521-523.
18. Sekine, K., et al., *Inhibition of initiation and early stage development of aberrant crypt foci and enhanced natural killer activity in male rats administered bovine lactoferrin concomitantly with azoxymethane*. Cancer Lett, 1997. **121**(2): p. 211-216.

19. Debbabi, H., et al., *Bovine lactoferrin induces both mucosal and systemic immune response in mice*. J Dairy Res, 1998. **65**(2): p. 283-293.
20. Iigo, M., et al., *Inhibitory effects of bovine lactoferrin on colon carcinoma 26 lung metastasis in mice*. Clin Exp Metastasis, 1999. **17**(1): p. 35-40.
21. Watanabe, A., et al., *Nutritional therapy of chronic hepatitis by whey protein (non-heated)*. J Med, 2000. **31**(5-6): p. 283-302.
22. Kimber, I., et al., *Lactoferrin: influences on Langerhans cells, epidermal cytokines, and cutaneous inflammation*. Biochem Cell Biol, 2002. **80**(1): p. 103-7.
23. Guillen, C., et al., *The effects of local administration of lactoferrin on inflammation in murine autoimmune and infectious arthritis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(9): p. 2073-2080.
24. Hayashida, K., et al., *Oral administration of lactoferrin inhibits inflammation and nociception in rat adjuvant-induced arthritis*. J Vet Med Sci, 2004. **66**(2): p. 149-154.
25. Zimecki, M., R. Miedzybrodzki, and S. Szymaniec, *Oral treatment of rats with bovine lactoferrin inhibits carrageenan-induced inflammation; correlation with decreased cytokine production*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 1998. **46**(6): p. 361-5.
26. Togawa, J., et al., *Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance*. J Gastroenterol Hepatol, 2002. **17**(12): p. 1291-8.
27. Togawa, J., et al., *Lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(1): p. G187-95.
28. Haversen, L.A., et al., *Anti-inflammatory activities of human lactoferrin in acute dextran sulphate-induced colitis in mice*. Scand J Immunol, 2003. **57**(1): p. 2-10.
29. Grey, V., et al., *Improved glutathione status in young adult patients with cystic fibrosis supplemented with whey protein*. J Cyst Fibros, 2003. **2**(4): p. 195-8.
30. Machnicki, M., M. Zimecki, and T. Zagulski, *Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 in vivo*. Int J Exp Pathol, 1993. **74**(5): p. 433-439.
31. Mattsby-Baltzer, I., et al., *Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells*. Pediatr Res, 1996. **40**(2): p. 257-262.
32. Penttila, I.A., et al., *Immune modulation in suckling rat pups by a growth factor extract derived from milk whey*. J Dairy Res, 2001. **68**(4): p. 587-599.
33. Virtanen, T., et al., *Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria*. J Appl Microbiol, 2007. **102**(1): p. 106-15.
34. Hernandez-Ledesma, B., et al., *Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(3): p. 588-93.
35. Vilela, R.M., et al., *High hydrostatic pressure enhances whey protein digestibility to generate whey peptides that improve glutathione status in CFTR-deficient lung epithelial cells*. Mol Nutr Food Res, 2006. **50**(11): p. 1013-29.

36. Gattegno, L., et al., *Enhancement of phagocytic activity of human monocytic-macrophagic cells by immunostimulating peptides from human casein*. Immunol Lett, 1988. **18**(1): p. 27-31.
37. Jaziri, M., et al., *Specific binding sites on human phagocytic blood cells for Gly-Leu-Phe and Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr, immunostimulating peptides from human milk proteins*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1160**(3): p. 251-261.
38. Li, E.W. and Y. Mine, *Immunoenhancing effects of bovine glycomacropeptide and its derivatives on the proliferative response and phagocytic activities of human macrophagelike cells, U937*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(9): p. 2704-2708.
39. Yoo, Y.C., et al., *Apoptosis in human leukemic cells induced by lactoferricin, a bovine milk protein-derived peptide: involvement of reactive oxygen species*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **237**(3): p. 624-628.
40. Murakami, M., et al., *Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (beta-lactosin B) isolated from a commercial whey product*. J Dairy Sci, 2004. **87**(7): p. 1967-74.
41. Pecquet, S., et al., *Peptides obtained by tryptic hydrolysis of bovine beta-lactoglobulin induce specific oral tolerance in mice*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(3): p. 514-521.
42. Han, Y.S., et al., *Short-term effect of partially hydrolyzed formula on the prevention of development of atopic dermatitis in infants at high risk*. J Korean Med Sci, 2003. **18**(4): p. 547-551.
43. Tanabe, S., et al., *Isolation and structural elucidation of a peptide derived from Edam cheese that inhibits beta-lactoglobulin transport*. J Dairy Sci, 2003. **86**(2): p. 464-468.
44. Peng, H.J., et al., *Effect of ingestion of cow's milk hydrolysed formulas on whey protein-specific Th2 immune responses in naive and sensitized mice*. Clin Exp Allergy, 2004. **34**(4): p. 663-670.
45. Chen, R.M., et al., *Increase of intestinal Bifidobacterium and suppression of coliform bacteria with short-term yogurt ingestion*. J Dairy Sci, 1999. **82**(11): p. 2308-14.
46. Shahani, K.M. and A.D. Ayebo, *Role of dietary lactobacilli in gastrointestinal microecology*. Am J Clin Nutr, 1980. **33**(11 Suppl): p. 2448-57.
47. Yasui, H., et al., *Immunomodulatory function of lactic acid bacteria*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1999. **76**(1-4): p. 383-9.
48. Mitsuoka, T., *Bifidobacteria and their role in human health*. Journal of industrial microbiology., 1990. **6**: p. 263-268.
49. Taranto, M.P., et al., *Bile salt plays a key role on cholesterol removal by Lactobacillus reuteri*. Biotechnology letters, 1997. **19**(9): p. 845-847.
50. Cross, M.L., et al., *Dietary intake of Lactobacillus rhamnosus HNOO1 enhances production of both Th1 and Th2 cytokines in antigen-primed mice*. Med Microbiol Immunol (Berl), 2002. **191**(1): p. 49-53.
51. Miettinen, M., J. Vuopio-Varkila, and K. Varkila, *Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria*. Infect Immun, 1996. **64**(12): p. 5403-5.

52. Clancy, R., *Immunobiotics and the probiotic evolution*. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2003. **38**(1): p. 9-12.
53. Gill, H.S., et al., *Enhancement of natural and acquired immunity by Lactobacillus rhamnosus (HN001), Lactobacillus acidophilus (HN017) and Bifidobacterium lactis (HN019)*. Br J Nutr, 2000. **83**(2): p. 167-76.
54. Perdigon, G., et al., *Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milk with Lactobacillus casei and Lactobacillus acidophilus*. Immunology, 1998. **63**: p. 17-23.
55. Schiffrin, E., et al., *Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria*. J Dairy Sci, 1994. **78**: p. 491-497.
56. Hori, T., J. Kiyoshima, and H. Yasui, *Effect of an oral administration of Lactobacillus casei strain Shirota on the natural killer activity of blood mononuclear cells in aged mice*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2003. **67**(2): p. 420-422.
57. Arunachalam, K., H.S. Gill, and R.K. Chandra, *Enhancement of natural immune function by dietary consumption of Bifidobacterium lactis (HN019)*. Eur J Clin Nutr, 2000. **54**(3): p. 263-7.
58. Haller, D., et al., *Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria in vitro: evidence of NK cells as primary targets*. Infect Immun, 2000. **68**(2): p. 752-9.
59. Chiang, B.L., et al., *Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (Bifidobacterium lactis HN019): optimization and definition of cellular immune responses*. Eur J Clin Nutr, 2000. **54**(11): p. 849-55.
60. Link-Amster, H., et al., *Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1994. **10**(1): p. 55-63.
61. Fang, H., et al., *Modulation of humoral immune response through probiotic intake*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2000. **29**(1): p. 47-52.
62. Isolauri, E., et al., *Lactobacillus casei strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats*. Gastroenterology, 1993. **105**(6): p. 1643-50.
63. Yasui, H. and M. Ohwaki, *Enhancement of immune response in Peyer's patch cells cultured with Bifidobacterium breve*. J Dairy Sci, 1991. **74**(4): p. 1187-95.
64. Park, J.H., et al., *Encapsulated Bifidobacterium bifidum potentiates intestinal IgA production*. Cellular Immunology, 2002. **219**(1): p. 22-27.
65. Ishida, Y., et al., *Decrease in ovalbumin specific IgE of mice serum after oral uptake of lactic acid bacteria*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2003. **67**(5): p. 951-957.
66. Erickson, K.L. and N.E. Hubbard, *Probiotic immunomodulation in health and disease*. J Nutr, 2000. **130**(2S Suppl): p. 403S-409S.
67. Laiho, K., et al., *Inventing probiotic functional foods for patients with allergic disease*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2002. **89**(6 Suppl 1): p. 75-82.
68. Viljanen, M., et al., *Induction of inflammation as a possible mechanism of probiotic effect in atopic eczema-dermatitis syndrome*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2005. **115**(6): p. 1254-1259.

69. Kalliomaki, M., et al., *Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial*. Lancet, 2001. **357**(9262): p. 1076-9.
70. Rosenfeldt, V., et al., *Effect of probiotic Lactobacillus strains in children with atopic dermatitis*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2003. **111**(2): p. 389-395.
71. Chapat, L., et al., *Lactobacillus casei reduces CD8+ T cell-mediated skin inflammation*. Eur J Immunol, 2004. **34**(9): p. 2520-8.
72. Bai, A.P., et al., *Probiotics modulate inflammatory cytokine secretion from inflamed mucosa in active ulcerative colitis*. Int J Clin Pract, 2006. **60**(3): p. 284-8.
73. Osman, N., et al., *Bifidobacterium infantis strains with and without a combination of oligofructose and inulin (OFI) attenuate inflammation in DSS-induced colitis in rats*. BMC Gastroenterol, 2006. **6**: p. 31.
74. Matsumoto, M. and Y. Benno, *Anti-inflammatory metabolite production in the gut from the consumption of probiotic yogurt containing Bifidobacterium animalis subsp. lactis LKM512*. Biosci Biotechnol Biochem, 2006. **70**(6): p. 1287-92.
75. Peran, L., et al., *Lactobacillus fermentum, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis*. Int J Colorectal Dis, 2006. **21**(8): p. 737-46.
76. Daniel, C., et al., *Selecting lactic acid bacteria for their safety and functionality by use of a mouse colitis model*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(9): p. 5799-805.
77. Di Giacinto, C., et al., *Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3237-46.
78. von der Weid, T., C. Bulliard, and E.J. Schiffrin, *Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD4(+) T cells with low proliferative capacity that produce transforming growth factor beta and interleukin-10*. Clin Diagn Lab Immunol, 2001. **8**(4): p. 695-701.
79. Niers, L.E., et al., *Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(11): p. 1481-9.
80. Fujii, T., et al., *Bifidobacterium breve enhances transforming growth factor beta1 signaling by regulating Smad7 expression in preterm infants*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2006. **43**(1): p. 83-8.
81. Jiang, S. and R.I. Lechler, *CD4+CD25+ regulatory T-cell therapy for allergy, autoimmune disease and transplant rejection*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2006. **5**(4): p. 239-42.
82. Faria, A.M. and H.L. Weiner, *Oral tolerance*. Immunol Rev, 2005. **206**: p. 232-59.
83. Ballas, Z.K., W.L. Rasmussen, and A.M. Krieg, *Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA*. J Immunol, 1996. **157**(5): p. 1840-5.
84. Yamamoto, S., et al., *Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity*. J Immunol, 1992. **148**(12): p. 4072-6.

85. Krieg, A.M., et al., *CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation*. Nature, 1995. **374**(6522): p. 546-9.
86. Messina, J.P., G.S. Gilkeson, and D.S. Pisetsky, *Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA*. J Immunol, 1991. **147**(6): p. 1759-64.
87. Klinman, D.M., et al., *CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(7): p. 2879-83.
88. Bohle, B., et al., *Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce IL-12, IL-18 and IFN-gamma production in cells from allergic individuals and inhibit IgE synthesis in vitro*. Eur J Immunol, 1999. **29**(7): p. 2344-53.
89. Halpern, M.D., R.J. Kurlander, and D.S. Pisetsky, *Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha*. Cell Immunol, 1996. **167**(1): p. 72-8.
90. Davis, H.L., et al., *CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen*. J Immunol, 1998. **160**(2): p. 870-6.
91. Eastcott, J.W., et al., *Oligonucleotide containing CpG motifs enhances immune response to mucosally or systemically administered tetanus toxoid*. Vaccine, 2001. **19**(13-14): p. 1636-42.
92. McCluskie, M.J. and H.L. Davis, *CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice*. J Immunol, 1998. **161**(9): p. 4463-6.
93. Krieg, A.M., et al., *The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines*. Trends Microbiol, 1998. **6**(1): p. 23-7.
94. Kitazawa, H., et al., *AT oligonucleotides inducing B lymphocyte activation exist in probiotic Lactobacillus gasseri*. Int J Food Microbiol, 2001. **65**(3): p. 149-62.
95. Kitazawa, H., et al., *Immunostimulatory oligonucleotide, CpG-like motif exists in Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus NIAI B6*. Int J Food Microbiol, 2003. **85**(1-2): p. 11-21.
96. Shimosato, T., et al., *Augmentation of T(H)-1 type response by immunoactive AT oligonucleotide from lactic acid bacteria via Toll-like receptor 9 signaling*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **326**(4): p. 782-7.
97. Katakura, K., et al., *Toll-like receptor 9-induced type I IFN protects mice from experimental colitis*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 695-702.
98. Lee, J., D. Rachmilewitz, and E. Raz, *Homeostatic effects of TLR9 signaling in experimental colitis*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1072**: p. 351-5.
99. Rachmilewitz, D., et al., *Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis*. Gastroenterology, 2004. **126**(2): p. 520-8.
100. Lammers, K.M., et al., *Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003. **38**(2): p. 165-72.
101. Looijesteijn, P.J., et al., *Physiological function of exopolysaccharides produced by Lactococcus lactis*. Int J Food Microbiol, 2001. **64**(1-2): p. 71-80.
102. Cerning, J. and V. Marshall, *Exopolysaccharides produced by the dairy lactic acid bacteria*. Microbiol., 1999. **3**: p. 195-209.

103. Suzuki, M., et al., *Cooperative role of T lymphocytes and macrophages in anti-tumor activity of mice pretreated with schizophyllan (SPG)*. Jpn J Exp Med, 1982. **52**(2): p. 59-65.
104. Nagaoka, M., et al., *Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides*. Biol Pharm Bull, 1994. **17**(8): p. 1012-17.
105. Chabot, S., et al., *Exopolysaccharides from Lactobacillus rhamnosus RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN-g in mouse splenocytes*. Lait, 2001. **81**: p. 683-697.
106. De Vuyst, L. and B. Degeest, *Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria*. FEMS Microbiol Rev, 1999. **23**(2): p. 153-77.
107. Onderdonk, A.B., et al., *Evidence for T cell-dependent immunity to Bacteroides fragilis in an intraabdominal abscess model*. J Clin Invest, 1982. **69**(1): p. 9-16.
108. Shapiro, M.E., et al., *Cellular control of abscess formation: role of T cells in the regulation of abscesses formed in response to Bacteroides fragilis*. J Immunol, 1986. **137**(1): p. 341-6.
109. Shapiro, M.E., et al., *Cellular immunity to Bacteroides fragilis capsular polysaccharide*. J Exp Med, 1982. **155**(4): p. 1188-97.
110. Cleary, J.A., G.E. Kelly, and A.J. Husband, *The effect of molecular weight and beta-1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)-beta-D-glucan*. Immunol Cell Biol, 1999. **77**(5): p. 395-403.
111. Czop, J.K. and K.F. Austen, *Properties of glycans that activate the human alternative complement pathway and interact with the human monocyte beta-glucan receptor*. J Immunol, 1985. **135**(5): p. 3388-93.
112. Doita, M., et al., *Effect of soluble aminated beta-1,3-D-polyglucose on human monocytes: stimulation of cytokine and prostaglandin E2 production but not antigen-presenting function*. J Leukoc Biol, 1991. **49**(4): p. 342-51.
113. Konopski, Z., R. Seljelid, and T. Eskeland, *Cytokines and PGE2 modulate the phagocytic function of the beta-glucan receptor in macrophages*. Scand J Immunol, 1993. **37**(5): p. 587-92.
114. Aderem, A. and D.M. Underhill, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 593-623.
115. Garner, R.E. and J.A. Hudson, *Intravenous injection of Candida-derived mannan results in elevated tumor necrosis factor alpha levels in serum*. Infect Immun, 1996. **64**(11): p. 4561-6.
116. Wang, Y., et al., *Cytokine involvement in immunomodulatory activity affected by Candida albicans mannan*. Infect Immun, 1998. **66**(4): p. 1384-91.
117. Matsunaga, K., et al., *Direct action of a protein-bound polysaccharide, PSK, on transforming growth factor-beta*. Immunopharmacology, 1998. **40**(3): p. 219-30.
118. Ng, T.B., *A review of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom Coriolus versicolor (Basidiomycetes: Polyporaceae)*. Gen Pharmacol, 1998. **30**(1): p. 1-4.
119. Rodrigues, K.L., J.C. Carvalho, and J.M. Schneedorf, *Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract*. Inflammopharmacology, 2005. **13**(5-6): p. 485-92.

120. Murofushi, M., et al., *Immunopotentiative effect of polysaccharide from kefir grain, KGF-C, administered orally in mice*. Immunopharmacology, 1986. **12**(1): p. 29-35.
121. Kitazawa, H., et al., *Augmentation of macrophage functions by an extracellular phosphopolysaccharide from Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Food microbiology, 2000. **17**: p. 109-118.
122. Kitazawa, H., et al., *Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Int J Food Microbiol, 1998. **40**(3): p. 169-75.
123. Kitazawa, H., et al., *Induction of IFN-gamma and IL-1 alpha production in macrophages stimulated with phosphopolysaccharide produced by Lactococcus lactis ssp. cremoris*. Int J Food Microbiol, 1996. **31**(1-3): p. 99-106.
124. Kitazawa, H., T. Yamaguchi, and T. Itoh, *B-cell mitogenic activity of slime products produced from slime-forming, encapsulated Lactococcus lactis ssp. cremoris*. J Dairy Sci, 1992. **75**(11): p. 2946-51.
125. Nakajima, H., T. Toba, and S. Toyoda, *Enhancement of antigen-specific antibody production by extracellular slime products from slime-forming Lactococcus lactis subspecies cremoris SBT 0495 in mice*. Int J Food Microbiol, 1995. **25**(2): p. 153-8.
126. Forsen, R., et al., *Immunobiological effects of Streptococcus cremoris from cultured milk "villi"; application f human lymphocyte culture techniques*. Int J Food Microbiol, 1987. **5**: p. 41-47.
127. Zubillaga, M., et al., *Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases*. Nutrition Research, 2001. **21**: p. 569-579.
128. Sengul, N., et al., *Effects of exopolysaccharide-producing probiotic strains on experimental colitis in rats*. Dis Colon Rectum, 2006. **49**(2): p. 250-8.
129. Isolauri, E., et al., *Probiotics: effects on immunity*. Am J Clin Nutr, 2001. **73**(2 Suppl): p. 444S-450S.
130. Gill, H.S. and K.J. Rutherford, *Viability and dose-response studies on the effects of the immunoenhancing lactic acid bacterium Lactobacillus rhamnosus in mice*. Br J Nutr, 2001. **86**(2): p. 285-9.
131. Rafter, J., *Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective*. Br J Nutr, 2002. **88 Suppl 1**: p. S89-94.
132. Christensen, H.R., H. Frokiaer, and J.J. Pestka, *Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells*. J Immunol, 2002. **168**(1): p. 171-8.
133. Yan, F. and D.B. Polk, *Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(52): p. 50959-50965.
134. Gennari, C., *Calcium and vitamin D nutrition and bone disease of the elderly*. Public Health Nutr, 2001. **4**(2B): p. 547-59.
135. Messinger-Rapport, B.J. and H.L. Thacker, *Prevention for the older woman. A practical guide to prevention and treatment of osteoporosis*. Geriatrics, 2002. **57**(4): p. 16-8, 21-4, 27.

136. Avenell, A., et al., *Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures associated with involutional and post-menopausal osteoporosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2005(3): p. CD000227.
137. Iso, H., et al., *Prospective study of calcium, potassium, and magnesium intake and risk of stroke in women*. Stroke, 1999. **30**(9): p. 1772-9.
138. Miller, G.D., et al., *Benefits of dairy product consumption on blood pressure in humans: a summary of the biomedical literature*. J Am Coll Nutr, 2000. **19**(2 Suppl): p. 147S-164S.
139. Bostick, R.M., et al., *Effect of calcium supplementation on serum cholesterol and blood pressure. A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial*. Arch Fam Med, 2000. **9**(1): p. 31-8; discussion 39.
140. Bell, L., et al., *Cholesterol-lowering effects of calcium carbonate in patients with mild to moderate hypercholesterolemia*. Arch Intern Med, 1992. **152**(12): p. 2441-4.
141. Zemel, M.B., *The role of dairy foods in weight management*. J Am Coll Nutr, 2005. **24**(6 Suppl): p. 537S-46S.
142. Zemel, M.B., et al., *Effects of calcium and dairy on body composition and weight loss in African-American adults*. Obes Res, 2005. **13**(7): p. 1218-25.
143. Zemel, M.B., *Calcium and dairy modulation of obesity risk*. Obes Res, 2005. **13**(1): p. 192-3.
144. Parikh, S.J. and J.A. Yanovski, *Calcium intake and adiposity*. Am J Clin Nutr, 2003. **77**(2): p. 281-7.
145. Soares, M.J., C. Binns, and L. Lester, *Higher intakes of calcium are associated with lower BMI and waist circumference in Australian adults: an examination of the 1995 National Nutrition Survey*. Asia Pac J Clin Nutr, 2004. **13**(Suppl): p. S85.
146. Cho, E., et al., *Dairy foods, calcium, and colorectal cancer: a pooled analysis of 10 cohort studies*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(13): p. 1015-22.
147. Gross, M.D., *Vitamin D and calcium in the prevention of prostate and colon cancer: new approaches for the identification of needs*. J Nutr, 2005. **135**(2): p. 326-31.
148. Weingarten, M.A., A. Zalmanovici, and J. Yaphe, *Dietary calcium supplementation for preventing colorectal cancer and adenomatous polyps*. Cochrane Database Syst Rev, 2005(3): p. CD003548.
149. Wallace, K., et al., *Effect of calcium supplementation on the risk of large bowel polyps*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(12): p. 921-5.
150. Peters, U., et al., *Calcium intake and colorectal adenoma in a US colorectal cancer early detection program*. Am J Clin Nutr, 2004. **80**(5): p. 1358-65.
151. Snoeijs, T., et al., *The combined effect of lead exposure and high or low dietary calcium on health and immunocompetence in the zebra finch (Taeniopygia guttata)*. Environ Pollut, 2005. **134**(1): p. 123-32.
152. Howell, C.J., et al., *Identification of an alveolar macrophage-derived activity in bronchial asthma that enhances leukotriene C4 generation by human eosinophils stimulated by ionophore A23187 as a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Am Rev Respir Dis, 1989. **140**(5): p. 1340-7.

153. Clevers, H.C., et al., *Calcium ionophore A23187 induces interleukin 2 reactivity in human T cells*. Scand J Immunol, 1985. **22**(6): p. 633-8.
154. Lugo, J.P., et al., *Early precursor thymocytes can produce interleukin 2 upon stimulation with calcium ionophore and phorbol ester*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(6): p. 1862-6.
155. Matsushima, K. and J.J. Oppenheim, *Calcium ionophore (A23187) increases interleukin 1 (IL-1) production by human peripheral blood monocytes and interacts synergistically with IL-1 to augment concanavalin A stimulated thymocyte proliferation*. Cell Immunol, 1985. **90**(1): p. 226-33.
156. Simon, P.L., *Calcium mediates one of the signals required for interleukin 1 and 2 production by murine cell lines*. Cell Immunol, 1984. **87**(2): p. 720-6.
157. Gearing, A.J., M. Wadhwa, and A.D. Perris, *Interleukin 2 stimulates T cell proliferation using a calcium flux*. Immunol Lett, 1985. **10**(5): p. 297-302.
158. Singh, M., *Role of micronutrients for physical growth and mental development*. Indian J Pediatr, 2004. **71**(1): p. 59-62.
159. Beaulieu, J., C. Dupont, and P. Lemieux, *Whey proteins and peptides: beneficial effects on immune health*. Therapy, 2006. **3**: p. 1-10.
160. Calder, P.C. and S. Kew, *The immune system: a target for functional foods?* Br J Nut, 2002. **88**: p. S165-S176.
161. Gewurz, H., et al., *C-reactive protein and the acute phase response*. Adv Intern Med, 1982. **27**: p. 345-72.
162. Fraser, I.P., H. Koziel, and R.A. Ezekowitz, *The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity*. Semin Immunol, 1998. **10**(5): p. 363-72.
163. Agrawal, A., et al., *Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 3998-4004.
164. Davis, W.C., et al., *Use of the mannan receptor to selectively target vaccine antigens for processing and antigen presentation through the MHC class I and class II pathways*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **969**: p. 119-25.
165. Clemens, M.J. and A. Elia, *The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function*. J Interferon Cytokine Res, 1997. **17**(9): p. 503-24.
166. Pestka, S., et al., *Interferons and their actions*. Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 727-77.
167. Ogura, Y., et al., *Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 4812-8.
168. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 816-25.
169. Akira, S., *TLR signaling*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **311**: p. 1-16.
170. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
171. Yarovinsky, F., et al., *TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein*. Science, 2005. **308**(5728): p. 1626-9.
172. O'Neill, L.A., *How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(1): p. 3-9.
173. Janeway, C.A. and P. Travers, *Immunobiologie*. De Boeck et Larcier ed. 1996, Paris. 582 pages.

174. Yamamoto, M., et al., *Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling*. J Immunol, 2002. **169**(12): p. 6668-72.
175. Samuel, C.E., *Antiviral actions of interferons*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(4): p. 778-809, table of contents.
176. Lin, Q., C. Dong, and M.D. Cooper, *Impairment of T and B cell development by treatment with a type I interferon*. J Exp Med, 1998. **187**(1): p. 79-87.
177. Honda, K., T. Mizutani, and T. Taniguchi, *Negative regulation of IFN-alpha/beta signaling by IFN regulatory factor 2 for homeostatic development of dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(8): p. 2416-21.
178. Schnare, M., et al., *Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 947-50.
179. Gallucci, S. and P. Matzinger, *Danger signals: SOS to the immune system*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(1): p. 114-9.
180. Guermonprez, P., et al., *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 621-67.
181. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
182. Cresswell, P., et al., *The nature of the MHC class I peptide loading complex*. Immunol Rev, 1999. **172**: p. 21-8.
183. Cresswell, P., *Invariant chain structure and MHC class II function*. Cell, 1996. **84**(4): p. 505-7.
184. Villadangos, J.A., et al., *Proteases involved in MHC class II antigen presentation*. Immunol Rev, 1999. **172**: p. 109-20.
185. Kropshofer, H., G.J. Hammerling, and A.B. Vogt, *The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules*. Immunol Rev, 1999. **172**: p. 267-78.
186. Porcelli, S.A. and R.L. Modlin, *The CDI system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 297-329.
187. Matsuda, J.L. and M. Kronenberg, *Presentation of self and microbial lipids by CDI molecules*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(1): p. 19-25.
188. Dong, H., et al., *B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion*. Nat Med, 1999. **5**(12): p. 1365-9.
189. Tseng, S.Y., et al., *B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells*. J Exp Med, 2001. **193**(7): p. 839-46.
190. Shuford, W.W., et al., *4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses*. J Exp Med, 1997. **186**(1): p. 47-55.
191. Lane, P., *Role of OX40 signals in coordinating CD4 T cell selection, migration, and cytokine differentiation in T helper (Th)1 and Th2 cells*. J Exp Med, 2000. **191**(2): p. 201-6.
192. Hartmann, G., G.J. Weiner, and A.M. Krieg, *CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9305-10.

193. Cella, M., et al., *Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA*. J Exp Med, 1999. **189**(5): p. 821-9.
194. Kalinski, P., et al., *T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal*. Immunol Today, 1999. **20**(12): p. 561-7.
195. Pulendran, B., K. Palucka, and J. Banchereau, *Sensing pathogens and tuning immune responses*. Science, 2001. **293**(5528): p. 253-6.
196. Iwasaki, A. and B.L. Kelsall, *Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells*. J Exp Med, 1999. **190**(2): p. 229-39.
197. Romagnani, S., *T-cell subsets (Th1 versus Th2)*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2000. **85**(1): p. 9-18; quiz 18, 21.
198. Bleackley, R.C., *A molecular view of cytotoxic T lymphocyte induced killing*. Biochem Cell Biol, 2005. **83**(6): p. 747-51.
199. Farber, D.L., *Control of adaptive immunity: from naive to memory*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2005. **40 Suppl 1**: p. S17-9.
200. Kedl, R.M. and M.F. Mescher, *Qualitative differences between naive and memory T cells make a major contribution to the more rapid and efficient memory CD8+ T cell response*. J Immunol, 1998. **161**(2): p. 674-83.
201. Yawalkar, N., et al., *Human afferent lymph from normal skin contains an increased number of mainly memory / effector CD4(+) T cells expressing activation, adhesion and co-stimulatory molecules*. Eur J Immunol, 2000. **30**(2): p. 491-7.
202. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
203. Baron, J.L., et al., *Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma*. J Exp Med, 1993. **177**(1): p. 57-68.
204. Garcia, S., J. DiSanto, and B. Stockinger, *Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation*. Immunity, 1999. **11**(2): p. 163-71.
205. Bachmann, M.F., et al., *Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection*. Eur J Immunol, 1999. **29**(1): p. 291-9.
206. Aggarwal, B.B. and K. Natarajan, *Tumor necrosis factors: developments during the last decade*. Eur Cytokine Netw, 1996. **7**(2): p. 93-124.
207. Brunda, M.J., *Interleukin-12*. J Leukoc Biol, 1994. **55**(2): p. 280-8.
208. Lauwerys, B.R., J.C. Renauld, and F.A. Houssiau, *Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin 12 and interleukin 18*. Cytokine, 1999. **11**(11): p. 822-30.
209. Edwards, J.P., et al., *Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(6): p. 1298-307.
210. Zlotnik, A., J. Morales, and J.A. Hedrick, *Recent advances in chemokines and chemokine receptors*. Crit Rev Immunol, 1999. **19**(1): p. 1-47.
211. Rollins, B.J., *Chemokines*. Blood, 1997. **90**(3): p. 909-28.
212. Bacon, K.B. and T.J. Schall, *Chemokines as mediators of allergic inflammation*. Int Arch Allergy Immunol, 1996. **109**(2): p. 97-109.

213. Szabo, M.C., et al., *Chemokine class differences in binding to the Duffy antigen-erythrocyte chemokine receptor*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25348-51.
214. Kim, H.Y. and H.S. Kim, *Upregulation of MIP-2 (CXCL2) expression by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in mouse peritoneal macrophages*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(1): p. 60-7.
215. Mbandi, E. and J.J. Pestka, *Deoxynivalenol and satratoxin G potentiate proinflammatory cytokine and macrophage inhibitory protein 2 induction by Listeria and Salmonella in the macrophage*. J Food Prot, 2006. **69**(6): p. 1334-9.
216. Garekar, S., S.M. Heidemann, and M. Glibetic, *Heat stress response results in increased macrophage inflammatory protein-2 concentration in a lipopolysaccharide-exposed macrophage cell line*. J Endotoxin Res, 2006. **12**(2): p. 87-92.
217. Xie, L., et al., *C-reactive protein augments interleukin-8 secretion in human peripheral blood monocytes*. J Cardiovasc Pharmacol, 2005. **46**(5): p. 690-6.
218. Knudsen, E., et al., *Macrophage-dependent regulation of neutrophil mobilization and chemotaxis during development of sterile peritonitis in the rat*. Eur J Haematol, 2002. **69**(5-6): p. 284-96.
219. Yoo, J.K., et al., *IL-18 induces monocyte chemotactic protein-1 production in macrophages through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and MEK/ERK1/2 pathways*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 8280-6.
220. Kang, J.H., et al., *Soybean saponins suppress the release of proinflammatory mediators by LPS-stimulated peritoneal macrophages*. Cancer Lett, 2005. **230**(2): p. 219-27.
221. Brummer, E., M. Kamberi, and D.A. Stevens, *Regulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and/or steroids given in vivo of proinflammatory cytokine and chemokine production by bronchoalveolar macrophages in response to Aspergillus conidia*. J Infect Dis, 2003. **187**(4): p. 705-9.
222. Delgado, M. and D. Ganea, *Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by VIP and PACAP in vitro and in vivo*. Arch Physiol Biochem, 2001. **109**(4): p. 377-82.
223. Bazzoni, F., et al., *Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8*. J Exp Med, 1991. **173**(3): p. 771-4.
224. Kasama, T., et al., *Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10*. J Immunol, 1994. **152**(7): p. 3559-69.
225. Kasama, T., et al., *Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha*. J Exp Med, 1993. **178**(1): p. 63-72.
226. Arbones, M.L., et al., *Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice*. Immunity, 1994. **1**(4): p. 247-60.
227. Carlos, T.M. and J.M. Harlan, *Leukocyte-endothelial adhesion molecules*. Blood, 1994. **84**(7): p. 2068-101.
228. Ley, K., et al., *Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo*. J Exp Med, 1995. **181**(2): p. 669-75.

229. von Andrian, U.H., et al., *Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(17): p. 7538-42.
230. Lasky, L.A., *Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 113-39.
231. Stoolman, L.M. and S.D. Rosen, *Possible role for cell-surface carbohydrate-binding molecules in lymphocyte recirculation*. J Cell Biol, 1983. **96**(3): p. 722-9.
232. Alon, R., et al., *Glycolipid ligands for selectins support leukocyte tethering and rolling under physiologic flow conditions*. J Immunol, 1995. **154**(10): p. 5356-66.
233. McEver, R.P., K.L. Moore, and R.D. Cummings, *Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions*. J Biol Chem, 1995. **270**(19): p. 11025-8.
234. Foxall, C., et al., *The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide*. J Cell Biol, 1992. **117**(4): p. 895-902.
235. Patel, K.D., et al., *Neutrophils use both shared and distinct mechanisms to adhere to selectins under static and flow conditions*. J Clin Invest, 1995. **96**(4): p. 1887-96.
236. Bargatze, R.F., et al., *Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells*. J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1785-92.
237. Spertini, O., et al., *P-selectin glycoprotein ligand 1 is a ligand for L-selectin on neutrophils, monocytes, and CD34+ hematopoietic progenitor cells*. J Cell Biol, 1996. **135**(2): p. 523-31.
238. Elices, M.J., et al., *VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site*. Cell, 1990. **60**(4): p. 577-84.
239. Marlin, S.D. and T.A. Springer, *Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1)*. Cell, 1987. **51**(5): p. 813-9.
240. Pena, L., et al., *Expression of fibronectin and its integrin receptor alpha 5 beta 1 in canine mammary tumours*. Res Vet Sci, 1994. **57**(3): p. 358-64.
241. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. **76**(2): p. 301-14.
242. Springer, T.A., *Adhesion receptors of the immune system*. Nature, 1990. **346**(6283): p. 425-34.
243. DeLisser, H.M., P.J. Newman, and S.M. Albelda, *Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31*. Immunol Today, 1994. **15**(10): p. 490-5.
244. Sastry, K. and R.A. Ezekowitz, *Collectins: pattern recognition molecules involved in first line host defense*. Curr Opin Immunol, 1993. **5**(1): p. 59-66.
245. Ravetch, J.V., *Fc receptors*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(1): p. 121-5.
246. Sheppard, F.R., et al., *Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(5): p. 1025-42.
247. Kleinert, H., et al., *Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase*. Eur J Pharmacol, 2004. **500**(1-3): p. 255-66.

248. Korhonen, R., et al., *Nitric oxide production and signaling in inflammation*. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2005. **4**(4): p. 471-9.
249. Touyz, R.M., *Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology*. *Antioxid Redox Signal*, 2005. **7**(9-10): p. 1302-14.
250. Babior, B.M., J.D. Lambeth, and W. Nauseef, *The neutrophil NADPH oxidase*. *Arch Biochem Biophys*, 2002. **397**(2): p. 342-4.
251. Bradley, P.P., et al., *Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker*. *J Invest Dermatol*, 1982. **78**(3): p. 206-9.
252. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *The definition and measurement of antioxidants in biological systems*. *Free Radic Biol Med*, 1995. **18**(1): p. 125-6.
253. Liang, B. and H.R. Petty, *Imaging neutrophil activation: analysis of the translocation and utilization of NAD(P)H-associated autofluorescence during antibody-dependent target oxidation*. *J Cell Physiol*, 1992. **152**(1): p. 145-56.
254. Kubes, P., et al., *Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells*. *Faseb J*, 1993. **7**(13): p. 1293-9.
255. Gaboury, J., et al., *Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide*. *Am J Physiol*, 1993. **265**(3 Pt 2): p. H862-7.
256. Demple, B., *Signal transduction by nitric oxide in cellular stress responses*. *Mol Cell Biochem*, 2002. **234-235**(1-2): p. 11-8.
257. Kurzelewski, M., E. Czarnowska, and A. Beresewicz, *Superoxide- and nitric oxide-derived species mediate endothelial dysfunction, endothelial glycocalyx disruption, and enhanced neutrophil adhesion in the post-ischemic guinea-pig heart*. *J Physiol Pharmacol*, 2005. **56**(2): p. 163-78.
258. Kulmacz, R.J., W.A. van der Donk, and A.L. Tsai, *Comparison of the properties of prostaglandin H synthase-1 and -2*. *Prog Lipid Res*, 2003. **42**(5): p. 377-404.
259. Lotzer, K., C.D. Funk, and A.J. Habenicht, *The 5-lipoxygenase pathway in arterial wall biology and atherosclerosis*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1736**(1): p. 30-7.
260. Montuschi, P., et al., *Pharmacological modulation of the leukotriene pathway in allergic airway disease*. *Drug Discov Today*, 2007. **12**(9-10): p. 404-12.
261. Calder, P.C., *Polyunsaturated fatty acids and inflammation*. *Biochem Soc Trans*, 2005. **33**(Pt 2): p. 423-7.
262. Gallin, J.I., I.M. Goldstein, and R. Snyderman, *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates.*, ed. R. Press. 1992, New York. 1186.
263. Sell, S., *Immunology, immunopathology and immunity*. Sixth Edition ed, ed. A. Press. 2001, Washington. 753.
264. Lee, K.S., et al., *Mast Cells can Mediate Vascular Permeability through Regulation of PI3K-HIF-1{alpha}-VEGF Axis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008.
265. Costa, J.J. and S.J. Galli, *Mast cells and basophils.*, in *Clinical Immunology: Principles and Practice*. 1996: St-Louis. p. 408-430.
266. Jeffery, P.K. and T. Haahtela, *Allergic rhinitis and asthma: inflammation in a one-airway condition*. *BMC Pulm Med*, 2006. **6 Suppl 1**: p. S5.
267. Cannistra, S.A. and J.D. Griffin, *Regulation of the production and function of granulocytes and monocytes*. *Semin Hematol*, 1988. **25**(3): p. 173-88.

268. Barreda, D.R., P.C. Hanington, and M. Belosevic, *Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors*. Dev Comp Immunol, 2004. **28**(5): p. 509-54.
269. Henderson, L.M. and J.B. Chappel, *NADPH oxidase of neutrophils*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1273**(2): p. 87-107.
270. Kishimoto, T.K. and R. Rothlein, *Integrins, ICAMs, and selectins: role and regulation of adhesion molecules in neutrophil recruitment to inflammatory sites*. Adv Pharmacol, 1994. **25**: p. 117-69.
271. Gullberg, U., et al., *Biosynthesis, processing and sorting of neutrophil proteins: insight into neutrophil granule development*. Eur J Haematol, 1997. **58**(3): p. 137-53.
272. Cham, B.P., J.M. Gerrard, and D.F. Bainton, *Granulophysin is located in the membrane of azurophilic granules in human neutrophils and mobilizes to the plasma membrane following cell stimulation*. Am J Pathol, 1994. **144**(6): p. 1369-80.
273. Berliner, N., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor induction of normal human bone marrow progenitors results in neutrophil-specific gene expression*. Blood, 1995. **85**(3): p. 799-803.
274. Ganz, T., et al., *Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils*. J Clin Invest, 1985. **76**(4): p. 1427-35.
275. Kinkade, J.M., Jr., et al., *Differential distribution of distinct forms of myeloperoxidase in different azurophilic granule subpopulations from human neutrophils*. Biochem Biophys Res Commun, 1983. **114**(1): p. 296-303.
276. Painter, R.G., et al., *The role of chloride anion and CFTR in killing of Pseudomonas aeruginosa by normal and CF neutrophils*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(6): p. 1345-53.
277. Choe, Y.H., et al., *Lactoferrin sequestration and its contribution to iron-deficiency anemia in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa*. J Gastroenterol Hepatol, 2003. **18**(8): p. 980-985.
278. Rice, W.G., et al., *Defensin-rich dense granules of human neutrophils*. Blood, 1987. **70**(3): p. 757-65.
279. Martin, L.B., et al., *Eosinophils in allergy: role in disease, degranulation, and cytokines*. Int Arch Allergy Immunol, 1996. **109**(3): p. 207-15.
280. Kirschfink, M., *Controlling the complement system in inflammation*. Immunopharmacology, 1997. **38**(1-2): p. 51-62.
281. Heng, Y.J., et al., *Interleukin-1 receptor antagonist in human cervicovaginal fluid in term pregnancy and labor*. Am J Obstet Gynecol, 2008.
282. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 749-95.
283. Border, W.A. and E. Ruoslahti, *Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair*. J Clin Invest, 1992. **90**(1): p. 1-7.
284. Taub, D.D., *Chemokine-leukocyte interactions. The voodoo that they do so well*. Cytokine Growth Factor Rev, 1996. **7**(4): p. 355-76.
285. Butcher, E.C. and L.J. Picker, *Lymphocyte homing and homeostasis*. Science, 1996. **272**(5258): p. 60-6.

286. Volkman, A. and J.L. Gowans, *The Origin of Macrophages from Bone Marrow in the Rat*. Br J Exp Pathol, 1965. **46**: p. 62-70.
287. Bosque, F., et al., *The biology of macrophages*. Pathol Biol (Paris), 1997. **45**(2): p. 103-9.
288. Allen, L.A. and A. Aderem, *Mechanisms of phagocytosis*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(1): p. 36-40.
289. Laskin, D.L. and K.J. Pendino, *Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1995. **35**: p. 655-77.
290. Altieri, D.C., *Inflammatory cell participation in coagulation*. Semin Cell Biol, 1995. **6**(5): p. 269-74.
291. Ben-Baruch, A., D.F. Michiel, and J.J. Oppenheim, *Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells*. J Biol Chem, 1995. **270**: p. 11703-11706.
292. Ruoslahti, E. and Y. Yamaguchi, *Proteoglycans as modulators of growth factor activities*. Cell, 1991. **64**: p. 867-869.
293. Vyse, T.J. and J.A. Todd, *Genetic analysis of autoimmune disease*. Cell, 1996. **85**(3): p. 311-8.
294. Mohan, C., *Environment versus genetics in autoimmunity: a geneticist's perspective*. Lupus, 2006. **15**(11): p. 791-3.
295. Edwards, C.J. and C. Cooper, *Early environmental exposure and the development of lupus*. Lupus, 2006. **15**(11): p. 814-9.
296. Wang, Y., et al., *Autoantibodies closely relate to the elevation level of in vivo hydrogen peroxide and tissue damage in systemic lupus erythematosus*. DNA Cell Biol, 2006. **25**(10): p. 563-70.
297. Becker-Merok, A., et al., *Alpha-actinin-binding antibodies in relation to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(6): p. R162.
298. Figueredo, M.A., et al., *Autoantibodies against C-reactive protein: clinical associations in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome*. J Rheumatol, 2006. **33**(10): p. 1980-6.
299. Becker-Merok, A., C. Nikolaisen, and H.C. Nossent, *B-lymphocyte activating factor in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in relation to autoantibody levels, disease measures and time*. Lupus, 2006. **15**(9): p. 570-6.
300. Amu, S., et al., *CD25-expressing B-lymphocytes in rheumatic diseases*. Scand J Immunol, 2007. **65**(2): p. 182-91.
301. van Venrooij, W.J., A.J. Zendman, and G.J. Pruijn, *Autoantibodies to citrullinated antigens in (early) rheumatoid arthritis*. Autoimmun Rev, 2006. **6**(1): p. 37-41.
302. Wang, B., et al., *CD4+ Th1 and CD8+ type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity*. J Immunol, 2000. **165**(12): p. 6783-90.
303. Desvignes, C., et al., *Oral administration of hapten inhibits in vivo induction of specific cytotoxic CD8+ T cells mediating tissue inflammation: a role for regulatory CD4+ T cells*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2515-22.
304. Xu, H., P.S. Heeger, and R.L. Fairchild, *Distinct roles for B7-1 and B7-2 determinants during priming of effector CD8+ Tc1 and regulatory CD4+ Th2 cells for contact hypersensitivity*. J Immunol, 1997. **159**(9): p. 4217-26.

305. Bovenschen, H.J., M.M. Seyger, and P.C. Van de Kerkhof, *Plaque psoriasis vs. atopic dermatitis and lichen planus: a comparison for lesional T-cell subsets, epidermal proliferation and differentiation*. *Br J Dermatol*, 2005. **153**(1): p. 72-8.
306. Bovenschen, H.J., et al., *Selective persistence of dermal CD8+ T cells in lesional plaque psoriasis after clobetasol-17 propionate treatment*. *Acta Derm Venereol*, 2005. **85**(2): p. 113-7.
307. Das, G., et al., *Pivotal roles of CD8+ T cells restricted by MHC class I-like molecules in autoimmune diseases*. *J Exp Med*, 2006. **203**(12): p. 2603-11.
308. Kuckelkorn, U., et al., *Link between organ-specific antigen processing by 20S proteasomes and CD8(+) T cell-mediated autoimmunity*. *J Exp Med*, 2002. **195**(8): p. 983-90.
309. Prinz, I., et al., *Promiscuous peptide recognition of an autoreactive CD8(+) T-cell clone is responsible for autoimmune intestinal pathology*. *J Autoimmun*, 2002. **18**(4): p. 281-7.
310. Wong, F.S., et al., *Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library*. *Nat Med*, 1999. **5**(9): p. 1026-31.
311. Mallone, R., et al., *CD8+ T-Cell Responses Identify {beta}-Cell Autoimmunity in Human Type 1 Diabetes*. *Diabetes*, 2007. **56**(3): p. 613-21.
312. Barral, A.M., et al., *SOCS-1 protects from virally-induced CD8 T cell mediated type 1 diabetes*. *J Autoimmun*, 2006. **27**(3): p. 166-73.
313. Dudek, N.L., et al., *Cytotoxic T-cells from T-cell receptor transgenic NOD8.3 mice destroy beta-cells via the perforin and Fas pathways*. *Diabetes*, 2006. **55**(9): p. 2412-8.
314. Oling, V., et al., *GAD65- and proinsulin-specific CD4+ T-cells detected by MHC class II tetramers in peripheral blood of type 1 diabetes patients and at-risk subjects*. *J Autoimmun*, 2005. **25**(3): p. 235-43.
315. Pearl-Yafe, M., et al., *Pancreatic islets under attack: cellular and molecular effectors*. *Curr Pharm Des*, 2007. **13**(7): p. 749-60.
316. Jang, E., et al., *Prevention of spontaneous arthritis by inhibiting homeostatic expansion of autoreactive CD4+ T cells in the K/BxN mouse model*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(2): p. 492-8.
317. Chen, Y., et al., *Several genes contribute to the production of autoreactive B and T cells in the murine lupus susceptibility locus *Sle1c**. *J Immunol*, 2005. **175**(2): p. 1080-9.
318. Goronzy, J.J. and C.M. Weyand, *Rheumatoid arthritis*. *Immunol Rev*, 2005. **204**: p. 55-73.
319. Mor, A., S.B. Abramson, and M.H. Pillinger, *The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction*. *Clin Immunol*, 2005. **115**(2): p. 118-28.
320. Ludewig, B., et al., *Dendritic cells in autoimmune diseases*. *Curr Opin Immunol*, 2001. **13**(6): p. 657-62.
321. Morel, P.A., et al., *Dendritic cells, T cell tolerance and therapy of adverse immune reactions*. *Clin Exp Immunol*, 2003. **133**(1): p. 1-10.
322. Proietto, A.I., et al., *Differential production of inflammatory chemokines by murine dendritic cell subsets*. *Immunobiology*, 2004. **209**(1-2): p. 163-72.

323. Blanco, P., et al., *Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus*. Science, 2001. **294**(5546): p. 1540-3.
324. Hooks, J.J., et al., *Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease*. N Engl J Med, 1979. **301**(1): p. 5-8.
325. Friedman, R.M., et al., *Interferon production in patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1982. **25**(7): p. 802-3.
326. Cravens, P.D. and P.E. Lipsky, *Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases*. Immunol Cell Biol, 2002. **80**(5): p. 497-505.
327. Cunnane, G., et al., *Early joint erosions and serum levels of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 3, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(10): p. 2263-74.
328. Taysi, S., et al., *Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis*. Rheumatol Int, 2002. **21**(5): p. 200-4.
329. Marklund, S.L., A. Bjelle, and L.G. Elmqvist, *Superoxide dismutase isoenzymes of the synovial fluid in rheumatoid arthritis and in reactive arthritides*. Ann Rheum Dis, 1986. **45**(10): p. 847-51.
330. Njoku, C.J., et al., *Inducible nitric oxide synthase inhibitors reduce urinary markers of systemic oxidant stress in murine proliferative lupus nephritis*. J Investig Med, 2005. **53**(7): p. 347-52.
331. Ferretti, G., et al., *Intracellular oxidative activity and respiratory burst of leukocytes isolated from multiple sclerosis patients*. Neurochem Int, 2006. **48**(2): p. 87-92.
332. Susztak, K., et al., *Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy*. Diabetes, 2006. **55**(1): p. 225-33.
333. Tran, V.V., et al., *Discrete and complementary mechanisms of protection of beta-cells against cytokine-induced and oxidative damage achieved by bcl-2 overexpression and a cytokine selection strategy*. Diabetes, 2003. **52**(6): p. 1423-32.
334. Crowle, A.J., *Delayed hypersensitivity in mice; its detection by skin tests and its passive transfer*. Science, 1959. **130**(3368): p. 159-60.
335. Asherson, G.L. and W. Ptak, *Contact and delayed hypersensitivity in the mouse. I. Active sensitization and passive transfer*. Immunology, 1968. **15**(3): p. 405-16.
336. de Sousa, M.A. and D.M. Parrott, *Induction and recall in contact sensitivity. Changes in skin and draining lymph nodes of intact and thymectomized mice*. J Exp Med, 1969. **130**(4): p. 671-90.
337. Crowle, A.J. and C.M. Crowle, *Contact sensitivity in mice*. J Allergy, 1961. **32**: p. 302-20.
338. Boguniewicz, M. and D.Y. Leung, *Pathophysiologic mechanisms in atopic dermatitis*. Semin Cutan Med Surg, 2001. **20**(4): p. 217-25.
339. Leung, D.Y. and N.A. Soter, *Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis*. J Am Acad Dermatol, 2001. **44**(1 Suppl): p. S1-S12.

340. Gad, S.C., et al., *Development and validation of an alternative dermal sensitization test: the mouse ear swelling test (MEST)*. Toxicol Appl Pharmacol, 1986. **84**(1): p. 93-114.
341. He, C., et al., *Stimulation of regional lymphatic and blood flow by epicutaneous oxazolone*. J Appl Physiol, 2002. **93**(3): p. 966-73.
342. Macatonia, S.E., et al., *Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells*. J Immunol, 1995. **154**(10): p. 5071-9.
343. O'Garra, A., *Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets*. Immunity, 1998. **8**(3): p. 275-83.
344. Macatonia, S.E., et al., *Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies*. J Exp Med, 1987. **166**(6): p. 1654-67.
345. Kripke, M.L., et al., *Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization*. J Immunol, 1990. **145**(9): p. 2833-8.
346. Bour, H., et al., *Major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ T cells and class II-restricted CD4+ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene*. Eur J Immunol, 1995. **25**(11): p. 3006-10.
347. Bouloc, A., A. Cavani, and S.I. Katz, *Contact hypersensitivity in MHC class II-deficient mice depends on CD8 T lymphocytes primed by immunostimulating Langerhans cells*. J Invest Dermatol, 1998. **111**(1): p. 44-9.
348. Saint-Mezard, P., et al., *Afferent and efferent phases of allergic contact dermatitis (ACD) can be induced after a single skin contact with haptens: evidence using a mouse model of primary ACD*. J Invest Dermatol, 2003. **120**(4): p. 641-7.
349. Traidl, C., et al., *Disparate cytotoxic activity of nickel-specific CD8+ and CD4+ T cell subsets against keratinocytes*. J Immunol, 2000. **165**(6): p. 3058-64.
350. Yawalkar, N., et al., *A comparative study of the expression of cytotoxic proteins in allergic contact dermatitis and psoriasis: spongiotic skin lesions in allergic contact dermatitis are highly infiltrated by T cells expressing perforin and granzyme B*. Am J Pathol, 2001. **158**(3): p. 803-8.
351. Trautmann, A., et al., *T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis*. J Clin Invest, 2000. **106**(1): p. 25-35.
352. Schwarz, A., et al., *Evidence for functional relevance of CTLA-4 in ultraviolet-radiation-induced tolerance*. J Immunol, 2000. **165**(4): p. 1824-31.
353. Cavani, A., et al., *Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(2): p. 295-302.
354. Biedermann, T., et al., *Reversal of established delayed type hypersensitivity reactions following therapy with IL-4 or antigen-specific Th2 cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(5): p. 1582-91.
355. Selye, H., *Use of granuloma pouch technic in the study of antiphlogistic corticoids*. Proc Soc Exp Biol Med, 1953. **82**(2): p. 328-33.
356. Edwards, J.C., A.D. Sedgwick, and D.A. Willoughby, *The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system*. J Pathol, 1981. **134**(2): p. 147-56.

357. De Brito, F.B., et al., *Polyarthritis and the air pouch reaction: dissimilarity of adjuvant and collagen models*. Immunopharmacology, 1988. **15**(2): p. 123-30.
358. Pelletier, M., et al., *Activation of human neutrophils in vitro and dieldrin-induced neutrophilic inflammation in vivo*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(3): p. 367-73.
359. Iida, M., et al., *Level of neutrophil chemotactic factor CINC/gro, a member of the interleukin-8 family, associated with lipopolysaccharide-induced inflammation in rats*. Infect Immun, 1992. **60**(4): p. 1268-72.
360. Vandal, K., et al., *Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide*. J Immunol, 2003. **171**(5): p. 2602-9.
361. Harmsen, A.G. and E.A. Havell, *Roles of tumor necrosis factor and macrophages in lipopolysaccharide-induced accumulation of neutrophils in cutaneous air pouches*. Infect Immun, 1990. **58**(2): p. 297-302.
362. Beutler, B. and A. Cerami, *Cachectin: more than a tumor necrosis factor*. N Engl J Med, 1987. **316**(7): p. 379-85.
363. Kindler, V., et al., *The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection*. Cell, 1989. **56**(5): p. 731-40.
364. Oshiro, T.M., M.S. Macedo, and M.F. Macedo-Soares, *Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of Ascaris suum*. Inflamm Res, 2005. **54**(1): p. 17-21.
365. Nielen, M.M., et al., *Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(2): p. 380-6.
366. Lanzavecchia, A., *Antigen uptake and accumulation in antigen-specific B cells*. Immunol Rev, 1987. **99**: p. 39-51.
367. Gonzalez-Quintal, R., et al., *Identification of clonally expanded T cells in rheumatoid arthritis using a sequence enrichment nuclease assay*. J Clin Invest, 1996. **97**(5): p. 1335-43.
368. Panayi, G.S., *B cells: a fundamental role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis?* Rheumatology (Oxford), 2005. **44 Suppl 2**: p. ii3-ii7.
369. Silverman, G.J. and D.A. Carson, *Roles of B cells in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2003. **5 Suppl 4**: p. S1-6.
370. Koch, A.E., S.L. Kunkel, and R.M. Strieter, *Cytokines in rheumatoid arthritis*. J Investig Med, 1995. **43**(1): p. 28-38.
371. Brennan, F.M., et al., *Detection of transforming growth factor-beta in rheumatoid arthritis synovial tissue: lack of effect on spontaneous cytokine production in joint cell cultures*. Clin Exp Immunol, 1990. **81**(2): p. 278-85.
372. Brennan, F.M., et al., *Detection of interleukin 8 biological activity in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and production of interleukin 8 mRNA by isolated synovial cells*. Eur J Immunol, 1990. **20**(9): p. 2141-4.
373. Seitz, M., et al., *Enhanced production of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in rheumatoid arthritis*. J Clin Invest, 1991. **87**(2): p. 463-9.
374. Issekutz, A.C., et al., *The role of tumour necrosis factor-alpha and IL-1 in polymorphonuclear leucocyte and T lymphocyte recruitment to joint inflammation in adjuvant arthritis*. Clin Exp Immunol, 1994. **97**(1): p. 26-32.
375. Rennie, K.L., et al., *Nutritional management of rheumatoid arthritis: a review of the evidence*. J Hum Nutr Diet, 2003. **16**(2): p. 97-109.

376. Adam, O., et al., *Anti-inflammatory effects of a low arachidonic acid diet and fish oil in patients with rheumatoid arthritis*. Rheumatol Int, 2003. **23**(1): p. 27-36.
377. Sundrarjun, T., et al., *Effects of n-3 fatty acids on serum interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and soluble tumour necrosis factor receptor p55 in active rheumatoid arthritis*. J Int Med Res, 2004. **32**(5): p. 443-54.
378. Remans, P.H., et al., *Nutrient supplementation with polyunsaturated fatty acids and micronutrients in rheumatoid arthritis: clinical and biochemical effects*. Eur J Clin Nutr, 2004. **58**(6): p. 839-45.
379. Hatakka, K., et al., *Effects of probiotic therapy on the activity and activation of mild rheumatoid arthritis--a pilot study*. Scand J Rheumatol, 2003. **32**(4): p. 211-5.
380. Yxfeldt, A., et al., *Homocysteine in patients with rheumatoid arthritis in relation to inflammation and B-vitamin treatment*. Scand J Rheumatol, 2003. **32**(4): p. 205-10.
381. Bendele, A., et al., *Animal models of arthritis: relevance to human disease*. Toxicol Pathol, 1999. **27**(1): p. 134-42.
382. Terato, K., et al., *Histological, immunological, and biochemical studies on type II collagen arthritis in rats*. Biomed Res, 1982. **3**: p. 495-523.
383. Trentham, D.E., A.S. Townes, and A.H. Kang, *Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis*. J Exp Med, 1977. **146**(3): p. 857-68.
384. Wooley, P.H., et al., *Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates*. J Exp Med, 1981. **154**(3): p. 688-700.
385. Wipke, B.T. and P.M. Allen, *Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1601-8.
386. Matsui, T., et al., *CD64 on neutrophils is a sensitive and specific marker for detection of infection in patients with rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2006. **33**(12): p. 2416-24.
387. Jarvis, J.N., et al., *Evidence for chronic, peripheral activation of neutrophils in polyarticular juvenile rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(5): p. R154.
388. Sarraj, B., et al., *Expression of CD44 and L-selectin in the innate immune system is required for severe joint inflammation in the proteoglycan-induced murine model of rheumatoid arthritis*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1932-40.
389. Jurjus, A.R., N.N. Khoury, and J.M. Reimund, *Animal models of inflammatory bowel disease*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2004. **50**(2): p. 81-92.
390. Kokesova, A., et al., *Oral administration of probiotic bacteria (E. coli Nissle, E. coli O83, Lactobacillus casei) influences the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis in BALB/c mice*. Folia Microbiol (Praha), 2006. **51**(5): p. 478-84.
391. Geier, M.S., et al., *Lactobacillus fermentum BR11, a potential new probiotic, alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) in rats*. Int J Food Microbiol, 2006.
392. Gaudier, E., et al., *The VSL# 3 probiotic mixture modifies microflora but does not heal chronic dextran-sodium sulfate-induced colitis or reinforce the mucus barrier in mice*. J Nutr, 2005. **135**(12): p. 2753-61.

393. Herias, M.V., et al., *Probiotic effects of Lactobacillus casei on DSS-induced ulcerative colitis in mice*. Int J Food Microbiol, 2005. **103**(2): p. 143-55.
394. Llopis, M., et al., *Mucosal colonisation with Lactobacillus casei mitigates barrier injury induced by exposure to trinitrobenzene sulphonic acid*. Gut, 2005. **54**(7): p. 955-9.
395. Peran, L., et al., *A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, Lactobacillus reuteri and Lactobacillus fermentum, in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis*. Br J Nutr, 2007. **97**(1): p. 96-103.
396. Uchida, M. and O. Mogami, *Milk whey culture with Propionibacterium freudenreichii ET-3 is effective on the colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid in rats*. J Pharmacol Sci, 2005. **99**(4): p. 329-34.
397. Lamine, F., et al., *Colonic responses to Lactobacillus farciminis treatment in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats*. Scand J Gastroenterol, 2004. **39**(12): p. 1250-8.
398. Morris, G.P., et al., *Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon*. Gastroenterology, 1989. **96**(3): p. 795-803.
399. Neurath, M.F., et al., *Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1281-90.
400. Okayasu, I., et al., *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice*. Gastroenterology, 1990. **98**(3): p. 694-702.
401. Shintani, N., et al., *Involvement of CD4+ T cells in the development of dextran sulfate sodium-induced experimental colitis and suppressive effect of IgG on their action*. Gen Pharmacol, 1998. **31**(3): p. 477-81.
402. Krieglstein, C.F., et al., *Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide*. J Exp Med, 2001. **194**(9): p. 1207-18.
403. Santos, L.M., et al., *Oral tolerance to myelin basic protein induces regulatory TGF-beta-secreting T cells in Peyer's patches of SJL mice*. Cell Immunol, 1994. **157**(2): p. 439-47.
404. Chen, Y., et al., *Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis*. Science, 1994. **265**(5176): p. 1237-40.
405. Mosmann, T.R. and S. Sad, *The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more*. Immunol Today, 1996. **17**(3): p. 138-46.
406. Maloy, K.J. and F. Powrie, *Regulatory T cells in the control of immune pathology*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 816-22.
407. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
408. Jordan, M.S., et al., *Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 301-6.
409. Apostolou, I., et al., *Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen*. Nat Immunol, 2002. **3**(8): p. 756-63.
410. Apostolou, I. and H. von Boehmer, *In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells*. J Exp Med, 2004. **199**(10): p. 1401-8.

411. Pasare, C. and R. Medzhitov, *Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1033-6.
412. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie, *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 295-302.
413. Powrie, F., et al., *A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells*. J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2669-74.
414. Asseman, C., et al., *An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation*. J Exp Med, 1999. **190**(7): p. 995-1004.
415. Netea, M.G., et al., *Toll-like receptor 2 suppresses immunity against Candida albicans through induction of IL-10 and regulatory T cells*. J Immunol, 2004. **172**(6): p. 3712-8.
416. Smits, H.H., et al., *Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2005. **115**(6): p. 1260-1267.
417. Peng, Y., et al., *TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(13): p. 4572-7.
418. Fantini, M.C., et al., *Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5149-53.
419. Fu, S., et al., *TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors*. Am J Transplant, 2004. **4**(10): p. 1614-27.
420. Girvin, A.M., et al., *A critical role for B7/CD28 costimulation in experimental autoimmune encephalomyelitis: a comparative study using costimulatory molecule-deficient mice and monoclonal antibody blockade*. J Immunol, 2000. **164**(1): p. 136-43.
421. Salomon, B., et al., *B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes*. Immunity, 2000. **12**(4): p. 431-40.
422. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 303-10.
423. Grohmann, U., et al., *CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 1097-101.
424. Chambers, C.A., et al., *CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 565-94.
425. Jiang, H., et al., *T cell vaccination induces T cell receptor Vbeta-specific Qa-1-restricted regulatory CD8(+) T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4533-7.

426. Sarantopoulos, S., L. Lu, and H. Cantor, *Qa-1 restriction of CD8+ suppressor T cells*. J Clin Invest, 2004. **114**(9): p. 1218-21.
427. Miller, A., et al., *Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(1): p. 421-5.
428. Gilliet, M. and Y.J. Liu, *Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells*. J Exp Med, 2002. **195**(6): p. 695-704.
429. Chang, C.C., et al., *Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4*. Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 237-43.
430. Cavani, A., et al., *Effector and regulatory T cells in allergic contact dermatitis*. Trends Immunol, 2001. **22**(3): p. 118-20.
431. Gearing, A.J. and W. Newman, *Circulating adhesion molecules in disease*. Immunol Today, 1993. **14**(10): p. 506-12.
432. Hjerkin, E.M., et al., *Influence of long-term intervention with dietary counseling, long-chain n-3 fatty acid supplements, or both on circulating markers of endothelial activation in men with long-standing hyperlipidemia*. Am J Clin Nutr, 2005. **81**(3): p. 583-9.
433. Seljeflot, I., et al., *Reduced expression of endothelial cell markers after 1 year treatment with simvastatin and atorvastatin in patients with coronary heart disease*. Atherosclerosis, 2002. **162**(1): p. 179-85.
434. Devaraj, S., A.V. Chan, Jr., and I. Jialal, *alpha-Tocopherol supplementation decreases plasminogen activator inhibitor-1 and P-selectin levels in type 2 diabetic patients*. Diabetes Care, 2002. **25**(3): p. 524-9.
435. Goudev, A., et al., *Reduced concentrations of soluble adhesion molecules after antioxidant supplementation in postmenopausal women with high cardiovascular risk profiles--a randomized double-blind study*. Cardiology, 2000. **94**(4): p. 227-32.
436. Strozyk, E., et al., *Differential effects of NF-kappaB on apoptosis induced by DNA-damaging agents: the type of DNA damage determines the final outcome*. Oncogene, 2006. **25**(47): p. 6239-51.
437. Liang, Y., Y. Zhou, and P. Shen, *NF-kappaB and its regulation on the immune system*. Cell Mol Immunol, 2004. **1**(5): p. 343-50.
438. Baeuerle, P.A. and T. Henkel, *Function and activation of NF-kappa B in the immune system*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 141-79.
439. Collins, T., et al., *Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers*. Faseb J, 1995. **9**(10): p. 899-909.
440. Riedel, C.U., et al., *Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF-kappaB activation*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(23): p. 3729-35.
441. Sougioultzis, S., et al., *Saccharomyces boulardii produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappaB-mediated IL-8 gene expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **343**(1): p. 69-76.

442. Ahn, K.S., et al., *Gamma-tocotrienol inhibits nuclear factor-kappaB signaling pathway through inhibition of receptor-interacting protein and TAK1 leading to suppression of antiapoptotic gene products and potentiation of apoptosis*. J Biol Chem, 2007. **282**(1): p. 809-20.
443. Shin, T.Y., et al., *Anti-inflammatory effect of Poncirus trifoliata fruit through inhibition of NF-kappaB activation in mast cells*. Toxicol In Vitro, 2006. **20**(7): p. 1071-6.
444. Hseu, Y.C., et al., *Anti-inflammatory potential of Antrodia Camphorata through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF-kappaB pathway*. Int Immunopharmacol, 2005. **5**(13-14): p. 1914-25.
445. Lee, S.Y., et al., *Inhibitory effect of green tea extract on beta-amyloid-induced PC12 cell death by inhibition of the activation of NF-kappaB and ERK/p38 MAP kinase pathway through antioxidant mechanisms*. Brain Res Mol Brain Res, 2005. **140**(1-2): p. 45-54.
446. Dumont, F.J., *Modulation of Th1 and Th2 responses for immunotherapy*. Expert Opinion in therapeutic patents, 2002. **12**(3): p. 341-367.
447. Cross, M.L., L.M. Stevenson, and H.S. Gill, *Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria?* Int Immunopharmacol, 2001. **1**(5): p. 891-901.
448. Ahmad, S.F., et al., *Amelioration of adjuvant-induced arthritis by ursolic acid through altered Th1/Th2 cytokine production*. Pharmacol Res, 2006. **53**(3): p. 233-40.
449. Finnegan, A., et al., *Proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis in BALB/c mice is a Th1-type disease regulated by Th2 cytokines*. J Immunol, 1999. **163**(10): p. 5383-90.
450. Mauri, C., M. Feldmann, and R.O. Williams, *Down-regulation of Th1-mediated pathology in experimental arthritis by stimulation of the Th2 arm of the immune response*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(3): p. 839-45.
451. Zhang, P., et al., *Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids modulate murine Th1/Th2 balance toward the Th2 pole by suppression of Th1 development*. J Nutr, 2005. **135**(7): p. 1745-51.
452. Nathan, C., *Neutrophils and immunity: challenges and opportunities*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(3): p. 173-82.
453. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
454. Langrish, C.L., et al., *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 233-40.
455. Aggarwal, S., et al., *Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17*. J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1910-4.
456. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
457. Iwakura, Y. and H. Ishigame, *The IL-23/IL-17 axis in inflammation*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1218-22.

458. Becker, C., et al., *Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells*. J Clin Invest, 2003. **112**(5): p. 693-706.
459. Forlow, S.B., et al., *Increased granulopoiesis through interleukin-17 and granulocyte colony-stimulating factor in leukocyte adhesion molecule-deficient mice*. Blood, 2001. **98**(12): p. 3309-14.
460. Ley, K., E. Smith, and M.A. Stark, *IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes*. Immunol Res, 2006. **34**(3): p. 229-42.
461. Kolls, J.K. and A. Linden, *Interleukin-17 family members and inflammation*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 467-76.
462. Nakae, S., et al., *IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 5986-90.
463. Mensah-Brown, E.P., et al., *IL-23 leads to diabetes induction after subdiabetogenic treatment with multiple low doses of streptozotocin*. Eur J Immunol, 2006. **36**(1): p. 216-23.
464. Miljkovic, D., et al., *Interleukin-17 stimulates inducible nitric oxide synthase-dependent toxicity in mouse beta cells*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(22): p. 2658-68.
465. He, D., et al., *CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 6852-8.
466. Lee, E., et al., *Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris*. J Exp Med, 2004. **199**(1): p. 125-30.
467. Piskin, G., et al., *In vitro and in situ expression of IL-23 by keratinocytes in healthy skin and psoriasis lesions: enhanced expression in psoriatic skin*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1908-15.
468. Zheng, Y., et al., *Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis*. Nature, 2007. **445**(7128): p. 648-51.
469. Ziolkowska, M., et al., *High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2832-8.
470. Cho, M.L., et al., *Effector function of type II collagen-stimulated T cells from rheumatoid arthritis patients: cross-talk between T cells and synovial fibroblasts*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(3): p. 776-84.
471. Murphy, C.A., et al., *Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1951-7.
472. Yu, J.J., et al., *An essential role for IL-17 in preventing pathogen- initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals*. Blood, 2007.
473. Schmidt, C., et al., *Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(1): p. 16-23.
474. Stallmach, A., et al., *Cytokine/chemokine transcript profiles reflect mucosal inflammation in Crohn's disease*. Int J Colorectal Dis, 2004. **19**(4): p. 308-15.

475. Fujino, S., et al., *Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease*. Gut, 2003. **52**(1): p. 65-70.
476. Hochrein, H., et al., *Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets*. J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5448-55.
477. Bilsborough, J., et al., *Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties*. Immunology, 2003. **108**(4): p. 481-92.
478. Roncarolo, M.G., M.K. Levings, and C. Traversari, *Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells*. J Exp Med, 2001. **193**(2): p. F5-9.
479. Roncarolo, M.G., et al., *Type 1 T regulatory cells*. Immunol Rev, 2001. **182**: p. 68-79.
480. Powrie, F., S. Mauze, and R.L. Coffman, *CD4+ T-cells in the regulation of inflammatory responses in the intestine*. Res Immunol, 1997. **148**(8-9): p. 576-81.
481. Groux, H., et al., *A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 737-42.
482. Rao, K.M., et al., *Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluorescein diacetate in the presence of a calmodulin inhibitor*. J Leukoc Biol, 1992. **51**(5): p. 496-500.
483. Keston, A.S. and R. Brandt, *The Fluorometric Analysis of Ultramicro Quantities of Hydrogen Peroxide*. Anal Biochem, 1965. **11**: p. 1-5.
484. Iribarren, P., et al., *Activation of macrophages by silicones: phenotype and production of oxidant metabolites*. BMC Immunol, 2002. **3**(1): p. 6.
485. Wang, W.P., et al., *Activation of intestinal mucosal immunity in tumor-bearing mice by lactoferrin*. Jpn J Cancer Res, 2000. **91**(10): p. 1022-1027.
486. Villa, P., et al., *Glutathione protects mice from lethal sepsis by limiting inflammation and potentiating host defense*. J Infect Dis, 2002. **185**(8): p. 1115-20.
487. Zelenay, S., et al., *Foxp3+ CD25- CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(11): p. 4091-6.
488. Maloy, K.J., et al., *CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms*. J Exp Med, 2003. **197**(1): p. 111-9.
489. Ramirez-Farias, C., et al., *Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of Bifidobacterium adolescentis and Faecalibacterium prausnitzii*. Br J Nutr, 2008: p. 1-10.
490. Le Blay, G., et al., *Prolonged intake of fructo-oligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats*. J Nutr, 1999. **129**(12): p. 2231-5.
491. Pescuma, M., et al., *Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: evolution of carbohydrates and protein content*. Food Microbiol, 2008. **25**(3): p. 442-51.
492. Ramchandran, L. and N.P. Shah, *Proteolytic profiles and angiotensin-I converting enzyme and alpha-glucosidase inhibitory activities of selected lactic acid bacteria*. J Food Sci, 2008. **73**(2): p. M75-81.
493. El-Zahar, K., et al., *Proteolytic degradation of ewe milk proteins during fermentation of yoghurts and storage*. Nahrung, 2003. **47**(3): p. 199-206.

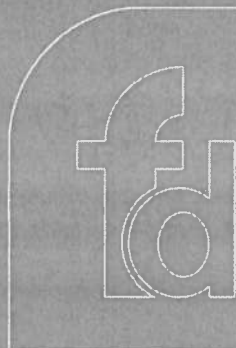
494. Alm, L., *Effect of fermentation on B-vitamin content of milk in Sweden*. Journal of Dairy Science, 1982. **65**: p. 353-359.
495. Rajalakshmi, R. and K. Vanaja, *Chemical and biological evaluation of the effects of fermentation on the nutritive value of foods prepared from rice and grams*. Br J Nutr, 1967. **21**(2): p. 467-73.
496. Shahani, K.M. and R.C. Chandan, *Nutritional and healthful aspects of cultured and culture-containing dairy foods*. J Dairy Sci, 1979. **62**(10): p. 1685-94.
497. Bjornson, B.H., J.M. Harvey, and L. Rose, *Differential effect of hydrocortisone on eosinophil and neutrophil proliferation*. J Clin Invest, 1985. **76**(3): p. 924-9.
498. Allen, D.B., *Effects of inhaled steroids on growth, bone metabolism, and adrenal function*. Adv Pediatr, 2006. **53**: p. 101-10.
499. Chavatte, C., et al., *Glucocorticoid pharmacokinetics and growth retardation in children with renal transplants*. Pediatr Nephrol, 2004. **19**(8): p. 898-904.
500. Higgs, G.A., R.J. Flower, and J.R. Vane, *A new approach to anti-inflammatory drugs*. Biochem Pharmacol, 1979. **28**(12): p. 1959-61.
501. Tarayre, J.P., et al., *Pharmacological study of cantharidin-induced ear inflammation in mice*. J Pharmacol Methods, 1984. **11**(4): p. 271-7.
502. Kish, D.D., A.V. Gorbachev, and R.L. Fairchild, *CD8+ T cells produce IL-2, which is required for CD(4+)CD25+ T cell regulation of effector CD8+ T cell development for contact hypersensitivity responses*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(3): p. 725-35.
503. Bernatsky, S., M. Hudson, and S. Suissa, *Anti-rheumatic drug use and risk of serious infections in rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2007. **46**(7): p. 1157-60.
504. Schneeweiss, S., et al., *Anti-tumor necrosis factor alpha therapy and the risk of serious bacterial infections in elderly patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(6): p. 1754-64.
505. Agusti, C., et al., *Fungal pneumonia, chronic respiratory diseases and glucocorticoids*. Med Mycol, 2006. **44 Suppl**: p. 207-11.
506. Daddaoua, A., et al., *Bovine glycomacropeptide is anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis*. J Nutr, 2005. **135**(5): p. 1164-70.
507. Vinderola, G., et al., *Effects of kefir fractions on innate immunity*. Immunobiology, 2006. **211**(3): p. 149-56.
508. de Moreno de LeBlanc, A., et al., *Study of cytokines involved in the prevention of a murine experimental breast cancer by kefir*. Cytokine, 2006. **34**(1-2): p. 1-8.
509. Meyer, A.L., et al., *Probiotic, as well as conventional yogurt, can enhance the stimulated production of proinflammatory cytokines*. J Hum Nutr Diet, 2007. **20**(6): p. 590-8.
510. Guyonnet, D., et al., *Effect of a fermented milk containing Bifidobacterium animalis DN-173 010 on the health-related quality of life and symptoms in irritable bowel syndrome in adults in primary care: a multicentre, randomized, double-blind, controlled trial*. Aliment Pharmacol Ther, 2007. **26**(3): p. 475-86.
511. Pochart, P., et al., *Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion*. Am J Clin Nutr, 1992. **55**(1): p. 78-80.

512. Jin, X., et al., *Toll-like receptors (TLRs) expression and function in response to inactivate hyphae of Fusarium solani in immortalized human corneal epithelial cells*. Mol Vis, 2007. **13**: p. 1953-61.
513. Garcia-Ramallo, E., et al., *Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation*. J Immunol, 2002. **169**(11): p. 6467-73.
514. Tessier, P.A., et al., *Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha*. J Immunol, 1997. **159**(7): p. 3595-602.
515. Hargrove, M.E., J. Wang, and C.C. Ting, *Regulation by glutathione of the activation and differentiation of IL-4-dependent activated killer cells*. Cell Immunol, 1993. **149**(2): p. 433-43.
516. Yim, C.Y., et al., *Use of N-acetyl cysteine to increase intracellular glutathione during the induction of antitumor responses by IL-2*. J Immunol, 1994. **152**(12): p. 5796-805.
517. Peristeris, P., et al., *N-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production*. Cell Immunol, 1992. **140**(2): p. 390-9.
518. Sato, M., et al., *Antioxidants inhibit tumor necrosis factor-alpha mediated stimulation of interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1, and collagenase expression in cultured human synovial cells*. J Rheumatol, 1996. **23**(3): p. 432-8.
519. Hodge, S., et al., *Surface and intracellular interleukin-2 receptor expression on various resting and activated populations involved in cell-mediated immunity in human peripheral blood*. Scand J Immunol, 2000. **51**(1): p. 67-72.
520. Querfeld, C., et al., *Phase II trial of subcutaneous injections of human recombinant interleukin-2 for the treatment of mycosis fungoides and Sezary syndrome*. J Am Acad Dermatol, 2007. **56**(4): p. 580-3.
521. Sedgwick, J.B., et al., *Effects of inflammatory cytokines on the permeability of human lung microvascular endothelial cell monolayers and differential eosinophil transmigration*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(5): p. 752-6.
522. Gloor, S.M., et al., *Interleukin-1 modulates protein tyrosine phosphatase activity and permeability of brain endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **239**(3): p. 804-9.
523. Zamuner, S.R. and C.F. Teixeira, *Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake Bothrops jararaca*. Mediators Inflamm, 2002. **11**(6): p. 351-7.
524. Utsunomiya, I., M. Ito, and S. Oh-ishi, *Generation of inflammatory cytokines in zymosan-induced pleurisy in rats: TNF induces IL-6 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) in vivo*. Cytokine, 1998. **10**(12): p. 956-63.
525. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
526. Chizzolini, C., et al., *Prostaglandin E2 (PGE2) synergistically with interleukin-23 (IL-23) favors human Th17 expansion*. Blood, 2008.
527. Kobayashi, T., et al., *IL-23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease*. Gut, 2008.

528. McGeachy, M.J. and D.J. Cua, *The link between IL-23 and Th17 cell-mediated immune pathologies*. *Semin Immunol*, 2007. **19**(6): p. 372-6.
529. Stark, M.A., et al., *Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17*. *Immunity*, 2005. **22**(3): p. 285-94.
530. Nakae, S., et al., *Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17*. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(5): p. 1258-68.
531. Nakae, S., et al., *Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses*. *Immunity*, 2002. **17**(3): p. 375-87.
532. McKenzie, B.S., R.A. Kastelein, and D.J. Cua, *Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway*. *Trends Immunol*, 2006. **27**(1): p. 17-23.
533. Kawaguchi, M., et al., *IL-17 cytokine family*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. **114**(6): p. 1265-73; quiz 1274.
534. Ye, P., et al., *Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense*. *J Exp Med*, 2001. **194**(4): p. 519-27.
535. Laurence, A., et al., *Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation*. *Immunity*, 2007. **26**(3): p. 371-81.
536. Xu, H., N.A. DiIulio, and R.L. Fairchild, *T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8+ T cells and interleukin (Il) 4/Il-10-producing (Th2) negative regulatory CD4+ T cells*. *J Exp Med*, 1996. **183**(3): p. 1001-12.

Annexe 1. Socioeconomic and health benefits of lactoceuticals

For reprint orders, please contact reprints@future-drugs.com



Socioeconomic and health benefits of lactoceuticals

Pierre Lemieux[†], Josée Beaulieu and Eric Simard

The rapid increase of healthcare and medication costs is a growing problem for industrialized countries. Several factors contribute to this problem and solutions are imperative to help the situation. In this review, the concept of lactoceuticals is introduced and why this class of product could have an impact in reducing healthcare and medication costs is explained. The term 'lactoceuticals' is defined and the key players already involved in this field are presented. This review will also summarize and list lactoceuticals that have reached a certain market maturity, and innovative lactoceuticals that will soon appear on the market following the correct clinical investigations and regulatory homologies.

Expert Rev. Pharmacoeconomics Outcomes Res. 4(2), 199–206 (2004)

The phenomenon of consistently increasing healthcare and medication costs is now spreading worldwide – especially to occidental countries. In the USA and Canada, the spending levels reached 17% between January 2001 and 2002. This increase is worrying not only to governmental healthcare systems but also for private health insurers. Companies offering collective insurance benefits to their employees see their premium go up by 15–20% each year. This increase in costs is mainly due to:

- Appearance of new medications on the market taping unmet needs
- Aging of the population
- Overprescription of drugs used prophylactically
- Poor diet adversely affecting the health of the general public

This last point appears to be the easiest to tackle so it should be a logical starting point to help with reducing healthcare and medication costs. A healthy diet and frequent consumption of fruit and vegetables along with a reduction in tobacco consumption and early detection are among the identified methods to help reduce the costs of healthcare. The Canadian government is unanimous to say that efforts to encourage the optimal use of medication is made not only by the pharmaceutical companies and physicians but also by the consumers.

Therefore, an improved diet and healthy lifestyle is desirable. The latter option is easy to put into practice when considering the concept that a healthy diet is the key to a long life. Development of food that would not only feed but maintain and/or correct health by having features that are desirable is imperative and is currently gaining in popularity.

Diseases driving healthcare medication costs & new trends

The most important and worrying health problems are cancer, obesity and diabetes leading to cardiovascular conditions. According to new figures released by the World Health Organization, cancer rates could increase by 50% by 2020. The World Cancer Report also suggests that healthy lifestyles and government initiatives could stem this trend and prevent as many as a third of cancers worldwide. Furthermore, as each day passes it would appear that new initiatives are taking place in the West to tackle the increasing problem of obesity and diabetes. In 2004, US President George W Bush announced that the fiscal year 2004 budget plan will include an increase of US\$ 25 million (€23 million) to US\$125 million for a new project to prevent diabetes, obesity and asthma. According to the US government, healthier lifestyles for Americans are

CONTENTS

Diseases driving healthcare medication costs & new trends

Definition & categories of lactoceuticals & their components

Therapeutic targets of lactoceuticals & targeted populations

Players in the field of lactoceuticals & their innovative products

Perspectives & challenges for the development of lactoceuticals

Expert opinion & five-year view

Key issues

References

Affiliations

[†] Author for correspondence
 Biolactis Inc., 531 Boul. Des
 Prairies, Building 18,
 Laval, Quebec,
 H7B 1B7, Canada
 Tel.: +1 450 686 5811
 Fax: +1 450 686 5501
plemieux@biolactis.com

KEYWORDS:
 benefits, health,
 lactoceuticals, socioeconomics

to be encouraged through community initiatives. This kind of intervention will stem the epidemic of preventable diseases that threaten many Americans. Many industrialized countries need to move from a healthcare system that treats disease to one that prevents disease through wiser personal choices. This new initiative will support community programs aimed at getting results and helping those at risk to avoid these diseases through proven prevention methods.

The incidence of diabetes and obesity among Americans has increased sharply over the last 10 years, putting millions more Americans at a higher risk for heart disease, stroke and other related medical conditions. Diabetes alone costs the US economy almost US\$100 billion each year in direct medical costs and indirect economic costs including disability, missed work and premature death. Not only do these preventable diseases take a toll on the lives of individual Americans but they also contribute to skyrocketing healthcare costs. Hence, new trends will have to do more to encourage individual Americans to take personal responsibility for their health choices and create a sense of social responsibility to ensure that policymakers support the kind of programs that foster healthy activity and prevention. A part of the 'Steps to a Healthier US' initiative, the government is aiming to prevent diabetes for at least 75,000 Americans and obesity for at least 100,000 individuals.

In terms of new trend, large companies are announcing that they will try to help in that sense. Kraft Foods Inc. (IL, USA), Nestlé (Vevay, Switzerland) and McDonald's (IL, USA) will offer healthier food and cut down on the content of some ingredients having bad press, such as fat, salt and sugar contained in their prepared food. Recently, the International Obesity Task Force produced a report highlighting the need for the food industry to be part of the solution rather than part of the problem in the growing levels of obesity in the USA and other countries. The organization is asking for a clear and more restrictive labeling of food products.

The US fast food group McDonald's have been associated with the negative image that fast food is inextricably linked to obesity – a serious health risk. McDonald's, which recently reported its first ever quarterly losses, is the latest multinational to jump onto the organic bandwagon currently occurring in the UK. They announced that they have begun to sell organic milk in its British restaurants since 2003. McDonald's is aiming to buck this trend by also using healthier ingredients. It has introduced lower fat sauces, diet drinks, sweeteners and promotional salads. Its switch to organic milk is part of a strategy to give the fast food chain a healthier and more environmentally-friendly image. Semiskimmed organic milk will be available in 250 ml bottles and certification will be provided by the UK organic certification body – the Soil Association [101]. Polls performed with consumers report that 60% of respondents are eating less fast food than they were 1 year ago and that a third of those who participated feel that chains such as McDonald's and Burger King® (FL, USA) will be forced to downsize due to the declining appeal of their trademark products. These companies must make enormous and important changes in their approach to food,

consumers and the health-related issues. They need to be proactive about questions regarding food safety and security and will have to deal with the issue of childhood obesity in a way that is both responsible and responsive.

With US obesity levels higher than ever – and with the UK catching up fast – the fast food chains are increasingly being seen as the culprits in markets where they have traditionally been popular. This wave of antifast food sentiment threatens to engulf the industry unless it is prepared to act quickly and decisively.

It is hard to imagine a world without fast food – modern lifestyles demand that food becomes even more convenient, but 10 years from now there may be many more salad bars and health food outlets alongside the burger, pizza and taco outlets, and for many people that will be a major improvement.

Thus, it is the beginning of an era for innovative products that will feed masses but also have health benefits that will impact on the outcome of health status of the general public. What would be the product that would have the greatest potential and the most impact to help maintain or correct the health of the general public? It has to be a product that the consumer is used to seeing in everyday life and that would be convenient for consumption. It also has to be associated with products that are already known to have health benefits but that would be innovative and will exploit a wide range of health benefits. Milk-based products answer this demand and have all the prerequisites to become the basis for multiple products having a variety of health benefits. In this context, it is noteworthy to say that milk products have the following important advantages:

- They have exceptional nutritional value: milk is the only food product aimed at feeding from a biological point of view
- They are well-positioned to allow the development of novel functional products already being extremely well implanted in our dietary habits
- They are supported by a strong and well-established industry on a global scale

It is not a coincidence that McDonald's has chosen to offer organic milk to attract attention on their intention to feed people more healthily. Milk has a history of being noble and has been linked to multiple health benefits from an early age. The literature is rich in clinical and laboratory data supporting the health benefits of milk and related products. Therefore, the authors decided to write a review to summarize the work that has been performed with milk to develop novel and innovative products having measurable *in vivo* biological and physiological effects that could help the health status of the general public and therefore, help reduce the burden of healthcare and medication costs on modern society. The authors have decided to call this new class of products 'lactoceuticals'.

Definition & categories of lactoceuticals & their components

In order to find and to be able to construct a list of the most interesting lactoceuticals, various internet searches were performed through engines such as Yahoo and on websites of companies known to develop milk protein-based ingredients. The

search for the health benefits of lactoceuticals was performed using sites such as MEDLINE, PubMed and the National Center for Biotechnology Information library. To help stimulate the interest of the reader, colostrum (although difficult to find commercially) and milk fortified with vitamin D can be considered as the first lactoceuticals. In this case, milk was used as a vehicle for vitamin D to synergize and increase calcium absorption in order to prevent rickets, a bone disease seen in children. Prior to the fortification of milk products in the 1930s, rickets was a major public health problem in the USA. Milk in the USA is now fortified with 10 mg (400 IU) of vitamin D per quart and rickets is now uncommon in the USA. A cup of vitamin D fortified milk supplies approximately a quarter of the estimated daily need for this vitamin for adults. Although milk is fortified with vitamin D, dairy products made from milk, such as cheese, yogurt and ice cream are generally not fortified with vitamin D.

To the authors knowledge, lactoceuticals is a novel term which can be considered as a subgroup of the large and growing family of products called nutraceuticals. In this review, the authors refer to lactoceuticals as:

'a product comprising any milk proteins from various sources that are either intact or modified using soft treatments that have a superior nutritional value over current milk-based products and exhibit exceptional and scientifically proven health benefits.'

The treatments previously described that can be applied to milk proteins are usually fermentations, purification systems of a different sort (e.g., ultrafiltration and high performance liquid chromatography) and enzymatic hydrolysis. The treatments can be performed separately or applied in combination. Lactoceuticals can be a mixture of milk proteins and do not necessarily need to be highly purified or manufactured according to pharmaceutical standards. The active principles found in lactoceuticals can comprise of milk proteins such as caseins, whey proteins, bioactive peptides originating from the fermentation process, bacteria that are used in the fermentation process and the various nutraceutical components secreted during the fermentation process (e.g., exopolysaccharide, antioxidant, vitamin, bacteriocin and antibiotics). It is important to note that bacteria used in the fermentation process to alter or modify milk proteins can have a probiotic status. In addition, all extra components that can be exogenously added to the lactoceuticals, such as calcium and vitamin D, are also considered lactoceuticals if associated with a health benefit (e.g., vitamin D – rickets and calcium – osteoporosis).

The review is intended to list only the lactoceuticals that are currently being sold on the market or under development that are the most promising and likely to proceed towards future clinical trial settings while reviewing solely recent clinical/*in vivo* findings reported in the last 5 years supporting the measurable health enhancing properties of lactoceuticals. Common nutritional qualities of milk protein-based products such as yogurts

found on the market will not be considered in this review unless exceptional. Although the concept of probiotics and prebiotics is undeniably an important contributing factor to the health benefits of lactoceuticals, this review is not intended to cover the aspects and the variety of health benefits of probiotics not prepared in milk or the biological activities of isolated milk proteins unless developed as a stand-alone with scientifically proven facts. This review is intended to cover the health benefits from the intuitive synergy (symbiotism) of several components of milk transformed by means of various processes and treatments. Excellent reviews have been written on both components (probiotics and prebiotics) and the following reviews can be consulted [3–5]. Finally, the reader can find in TABLE 1, a list of lactoceuticals that are classified according to the following categories:

- Fermented milks
- Fermented whey
- Milk and whey proteins
- Bioactive peptides from milk or whey
- Milk or whey as vehicle or protective matrix for active ingredients

Therapeutic targets of lactoceuticals & targeted populations

Lactoceuticals have the potential to target various systems such as the nervous, cardiovascular, urogenital, immune and digestive systems, the latter being the most important. Having multiple targets, lactoceuticals lead to the following health benefits and improve several conditions such as heart disease and all corresponding cardiovascular conditions such as hypertension, atherosclerosis caused by abnormal circulating lipid levels, stimulation of the immune system, downregulation of inflammation, thrombotic activity, opioid-like effect, and reduction of allergies, cancer, obesity and osteoporosis.

The first biological system to be in contact with ingested lactoceuticals is the digestive system. Growing attention is focusing on the latter but it is often forgotten that the digestive system is complex and probably the main entry of a variety of environmental and food material. This entry is approximately 8–9 m long. It begins at the mouth and ends at the anus. Food takes between 1 and 3 days to travel its entire length. The digestive system is lined with bacteria and other microorganisms known as the intestinal flora. Intestinal flora refers to all the microorganisms that live in the human digestive system. Without these our digestive system would not function efficiently. The intestine is a warm environment for the largest human collection of microbes. Although the true extent of the biodiversity is not known, it appears that the gut contains at least 1000 different species of bacteria and that their collective genomes ('the microbiome') contains 100-fold more genes than the human genome. These bacteria provide certain metabolic capabilities that humans lack, including the ability to process nutrients that human genes cannot break down. The digestive system has four main functions:

Table 1. Categories of lactoceuticals.

Category	Name of product or protein/peptides	Action	Company or developers	Species tested	Ref.
Fermented milks	Yakult	Triglyceride-lowering	Yakult Honsa	Hamsters	[18]
	<i>L. delbrueckii</i> subspecies <i>bulgaricus</i> OLL1073R-1	Reduction of arthritis	Meiji Dairy Co.	Rats	[19]
	Kefram- Kefir	Insulin responsiveness	Nihon Kefir Co., Fujisawa	Mice	[10]
	Calpis (<i>L. helveticus</i>)	Antihypertensive	Calpis Food Industry Co. Ltd	Humans	[11]
	Evolus (<i>L. helveticus</i> K16H)	Antihypertensive	Valio Ltd	Humans	[12]
	Actimel	Control acute diarrhea	Danone	Humans	[13]
	Biola (<i>L. GG</i>)	Stomach disorders	Tine	Humans	[14]
	Gaio	Cholesterol control	Gaio	Humans	[15]
	<i>L. helveticus</i> R389	Immunostimulation	Institut Rosell	Mice	[16]
<i>Lactobacillus casei</i> TMC0409 and <i>Streptococcus thermophilus</i> TMC 1543	Control of serum lipids and hypertension	Takanashi Milk Products Co. Ltd	Humans	[17]	
Fermented whey	Nutrilactis™	Multifunctional	Technologie Biolactis Inc.	Humans	[SIMARD ET AL. SUBMITTED]
Milk or whey proteins	Lactoferrin	Immunostimulator, multifunctional	DMV International, Glanbia	Humans	[18]
	Lactoperoxidase	Anti-infective	DMV International, Glanbia	Humans	[19]
	HMS90 (immunocal)	Glutathion modulation	Immunotec Research Ltd	Humans	[20]
	Prodiet 352 EFA(α lactalbumin)	Antibacterial, fixes minerals, can boost immune system	Ingredia	Humans	[21]
	Volactive	Antioxidant, antibacterial activity and immunomodulatory, regulation of muscle protein	Volac International	Humans	[22]
	Imuplus	Immune stimulator	Biogene	Humans	[23]
Bioactive peptides from milk or whey proteins	Prodiet F200	Stress-releving	Ingredia	Rat	[24]
	BioPURE-GMP®	Satiety, protection against toxins, bacteria and viruses and modulation of the immune system	Davisco, Land O'Lakes	Humans	[25]
	BioZate®	Antihypertensive	Davisco	Humans	[26]
Milk or whey proteins as vehicle or protective matrix for active ingredients	Lipidolactis (synergy with B vitamins)	Triglyceride-lowering	Technologie Biolactis Inc.	Rats	[JLEMIEUX SUBMITTED]
	Lactoal (calcium, phosphate, magnesium)	Bone health, osteoporosis	DMV International	Humans	[28]
	TruCal (calcium)		Glanbia		
	Omega-3 (CV-17)	Prevents heart disease (cholesterol-lowering)	Puleva Biotech	Humans	[29]
	Vitamin D	Bone diseases	Milk companies	Humans	[1,2]

- **Transportation:** movement of food through the digestive system
- **Secretion:** release of fluids, such as enzymes and acids into the digestive system to assist digestion
- **Digestion:** process of breaking down food to allow release of nutrients (carbohydrate, protein, fat, vitamins and minerals), in the form of their smallest components, for absorption into the body
- **Absorption:** process of nutrients being transported through the digestive system wall to the bloodstream

In the average human lifetime, the digestive system handles approximately 65 tonnes of food and drink. This is equal to the weight of 12 elephants. Probiotic products that contain live microbial cultures, prebiotic products that selectively stimulate the growth of probiotics, and synbiotic products that combine probiotics and prebiotics all exert a positive effect on digestive health and overall well-being [6].

It is important to note that the role of the digestive tract goes beyond the four functions described above. For instance, there is a clear connection with the immune function and the intestinal microflora which attracts research and consumer interest and significant advances are being made [7]. However, most mass market consumers appear to lack a clear understanding of the specific nature of gastrointestinal functioning and the concept of probiotic action. This dearth of knowledge tends to be more evident in the case of prebiotic and synbiotic concepts. This situation poses the same critical challenge for the lactoceutical industry, there are encouraging signs that growing consumer awareness about the health benefits offered by lactoceuticals will boost consumption levels and their impact on healthcare and medication costs. Across the world, there has been a general upswing in consumer interest regarding functional foods, bolstered by positive media coverage of probiotic health benefits. It is expected that the increasing number of lactoceuticals available and advertised in the market will improve consumer understanding of the concepts and the functionality involved. Lactoceuticals will enjoy better acceptance in the future through this improved understanding. Demand for lactoceuticals will also be driven by a rapidly ageing population. Lactoceuticals will become more important since they offer the prospect of averting or at the very least, delaying age-associated degenerative diseases and poor dieting self-inflicted conditions. Lactoceuticals are emerging at the forefront in the search for food-based drug substitutes to combat lifestyle-related diseases. Their role in controlling high blood pressure and obesity – two key risk factors for cardiovascular disease – is well-documented [11,21]. They are also relevant in the battle against colon cancer and Type 2 diabetes, and are thought to boost the immune system, thereby reducing the effects of stress on health.

The interest in natural alternatives to replace conventional medicine will also affect the rise in the consumption of lactoceuticals. This is expected to parallel the shift by health-conscious consumers from a negative approach, such as removing ingredients through reducing salt, fat and sugar, to a more positive approach;

fortifying food through vitamins, supplements, minerals and probiotic and prebiotic ingredients. The widespread and growing popularity of probiotic yogurt, driven partly by convenience and health considerations, will also be applicable and the key to market growth of lactoceuticals. Not surprisingly, probiotic yoghurt constitutes the largest segment in the probiotic dairy foods market, accounting for 82% of the total probiotic dairy product. This dominance is forecast to continue over the medium term.

Players in the field of lactoceuticals & their innovative products

This section will highlight the principal players in this field and summarize the various lactoceuticals that can be found on the market or are being developed by the industry and/or research laboratory (TABLE I). It is important to note that there is a trend with regards to the formation of groups and ventures uniting forces for the development and creation of innovative lactoceuticals. In order to develop innovative products, research and development activities will have to endure state-of-the-art techniques and methods developed and applied by the pharmaceutical industry. For instance, techniques of purification such as high pressure liquid chromatography and ultrafiltration, recombinant DNA technology (not used to produce genetically-modified lactoceuticals), and tools that can help with the rapid screening of a wide array of novel lactoceuticals such as those used in the genomic era, are now being applied to nutrition (nutrigenomics) thus aiding the development of lactoceuticals. This approach will dissect the effect of multiple components of lactoceuticals such as peptides and various fermentation products. For instance, the authors witnessed the creation of a venture called LactoPharma to achieve this goal. This venture is receiving funding for research on milk health benefits. This is a joint venture between the New Zealand dairy company Fonterra and the University of Auckland (New Zealand), that will focus on the use of milk to enhance bone growth and in the treatment of cancer and inflammatory diseases. New Zealand's Foundation for Research Science and Technology will match funding from Fonterra over the next 7 years to reach a total of approximately €14.2 million.

In Spain, Puleva Biotech is researching milk proteins for functional foods. Puleva Biotech, the biotechnology unit of Spanish food company Ebro Puleva (Spain) has started researching the production of proteins with health benefits. As part of the project, the company plans to obtain products of nutritional or pharmacological value, which can be incorporated as 'functional ingredients' in the food products of Ebro Puleva or other companies. Dairy product sales at the Ebro Puleva group reached €522.2 million in 2002, helped by the successful launch of a range of functional dairy products and dairy drinks. Ebro also claimed that its Puleva brand of milk was the only one in the Spanish market to show any growth in 2002, with its functional Puleva Calcio[®] and Puleva Omega 3[®] functional brands showing the most growth. Puleva Biotech has lodged two international patent applications for the treatment of Alzheimer's disease and cardiovascular illness. They have discovered a natural product that

inhibits 'cellular death in the central nervous system'. The product acts directly on neurons and protects them against different kinds of cellular damage.

In Japan, Minoru Shirota (Kyoto Imperial University School of Medicine, Japan) wanted to make beneficial bacteria easily available to everyone. He developed a fermented milk drink as a vehicle for the bacteria. To make it globally accessible, he named it Yakult, inspired by the Esperanto word for yogurt. Yakult is a fermented milk drink that contains a very high concentration of a unique, beneficial bacterium called *Lactobacillus casei* Shirota strain. This bacteria was named after Minoru Shirota and is exclusive to Yakult. Every human has approximately 100 trillion bacteria in our intestines. Some of these are beneficial and some are potentially harmful to our health. To work efficiently, the human digestive system needs a healthy balance of beneficial and potentially harmful bacteria. The unique beneficial bacteria in Yakult are strong enough to survive the journey through the stomachs gastric juices to reach the small intestine alive, where they help maintain an ideal balance of beneficial bacteria. Each 65 ml bottle contains hundreds of millions of these highly acid-resistant bacteria. Yakult began creating and selling pharmaceuticals in 1962, most of which contained live friendly bacteria. For the past 10 years, Yakult started creating and selling cosmetics using their knowledge of bacteria to make unique make-up and skin care products. Dairy Industries International reported that Yakult Honsha (Japan), producer of the Yakult probiotic drink, had an increase in royalty payments from strong worldwide sales of the drink, which boosted its results in 2001. For the past 12 months, profit was up by 5.5% on the year 2000 figures to ¥22.77 billion (€196.6m). According to the company, that income included €37.5 million in royalty revenues and €40.8 million profit from investment in its foreign affiliates. Yakult Honsha was formed in 1955 and its drink is now sold in 23 countries.

In Canada, Technologie Biolactis Inc. is a biotechnology company originating from the need to find a solution to the heavy production of whey by local and mid-size cheese makers. A local cheese manufacturer (Fromagerie Boivin, QC, Canada) has funded research and development activities to produce a new generation of lactoceuticals based on fermented whey proteins. Several strains of bacteria have been adapted to grow in whey to generate a line of innovative lactoceuticals having a cream-like appearance with no fat and being low in calories. The product can be described as a malleable protein matrix that can be used as a vehicle to formulate and synergize with bioactive ingredients but also as a novel bioactive ingredient leading to the formulation of functional foods. The ingredients exhibit a wide array of biological activities, such as the stimulation of the immune system (*Immunolactis*), protection against intestinal inflammation (*Intestilactis*), control of body weight (*Controlactis*) and the blood lipids (*Lipidolactis*), increase the bioavailability of calcium (*Osteolactis*) and the control of hypertension (*Cardiolactis*). The first product to be developed is *Nutrilactis*, which is used to reduce fat in butter and whipped cream but also to fortify those products with extra proteins.

The US supplier of applied protein sciences Proliant (IA, USA) and Trega Foods (WI, USA), latterly known as Weyauwega Milk Products, a manufacturer of cheese and dairy-based

ingredients, announced a joint venture for the production, sales and marketing of whey protein isolates. According to the two companies, the joint venture unites Proliant's worldwide sales, marketing, research and development and application research with Trega Foods' manufacturing capabilities. In 1991, Proliant extended its line of protein products to include dairy proteins due to a joint venture with the Hilmar Cheese company (CA, USA). The joint venture with Trega Foods is a way for Proliant's Dairy Ingredients Division to extend and build upon the success of their existing dairy protein business with the Hilmar Cheese company, offering additional dairy ingredients and exciting, new, proprietary manufacturing capabilities. Proliant's Dairy Ingredients Division provides speciality dairy proteins to the food industry.

Davisco Foods International (MN, USA) is a privately held, family-owned business with an aggressive, entrepreneurial vision. Three generations of confident, risk-taking expansion have made of Davisco a leader in the dairy industry. Meticulous about quality control and excellent customer service, Davisco has made it a mission to lead the industry in food technology by producing innovative proteins for health and nutrition. A pioneer in whey protein isolate research, Davisco produces 10 million lbs of whey protein isolates annually. Davisco is the industry leader in technology and production, accounting for 65% of whey protein isolates sold worldwide. Currently, whey protein isolates are found in 50% of grocery products, including sports drinks, reduced fat candies, low fat salad dressings, infant formula, yogurts, dips, shelf-stable baking mixes and low fat cheese sauces. Davisco produces a variety of customized whey protein products and a full line of whey protein products, including products falling under the authors' definition of lactoceuticals: BiPRO[®], BioZate[®], BioPURE-GMP[®], BioPURE-AlphaLactalbumin[™] (TABLE 1).

Finally, the French homeopathy specialist called Dolisos is launching a milk protein-based supplement designed to treat stress, into the UK market. Their product seriane contains a new molecule produced from a casein decapeptide derived from hydrolyzed milk proteins. It is the first Dolisos product available in the UK. The company did not reveal plans to launch the product in other markets. Studies indicate that the peptide may help those who suffer from occasional stress, according to the Toulouse-based company. It adds that the product has a soothing effect and does not lead to addiction or other side effects such as weight gain. Priced at £12.95 (€18.80) per pack of 20 capsules, Seriane is currently only available via mail order. It is the first 'stress' supplement in the Dolisos range.

Perspectives & challenges for the development of lactoceuticals

The market size for the lactoceuticals listed above is huge since they cover most diseases that people are either concerned about or afflicted by. Despite their great potential, it is difficult to evaluate the market of lactoceuticals, but alone the market of functional food was estimated at US\$50 billion in 2002 and to reach US\$75 billion by 2007. The potential economical benefits for

society and developers is significant since the raw material is relatively cheap and the costs to support clinical trials to prove health benefits in nutrition are reasonable compared with the development of pharmaceutical products. Lactoceuticals can be a mixture of milk proteins (a complex biological mixture) and can therefore be offered as a functional food and not necessarily as a nutraceutical (tablet or capsule), thus simplifying the manufacturing and lowering the production costs. This will have an impact on reducing the cost of the product and to make it more easily available to the consumer. Despite lactoceutical health claims legislation and regulatory affairs appearing easy, the regulatory status of lactoceuticals is complex and dependent upon the extent of the claims [31]. Each country has its own rules or laws that are being written. This issue is discussed in each country and at the Codex Alimentarius Commission making it an international effort. Finally, most of the costs of launching lactoceuticals into the market will come from the marketing of such products. To bring innovative lactoceuticals or any novel product to the consumer market takes money and patience unless there is clear commitment from governments to ease the time to market by helping with the promotion of such a product. According to the American Council on Science and Health, lactoceuticals are linked to probiotics and the health benefits support an effect on gastrointestinal health and boost immunity. Furthermore, the council judges that the evidence to support health benefits of lactoceuticals is weak and too often limited to *in vitro* and *in vivo* data (animal data) rather than clinical data in contrast to other functional food items such as soy-, plant sterol-, psyllium- and whole oat-based products [32].

The cost to market and the marketing strategy of lactoceuticals will be similar to what was witnessed with prebiotics, probiotics and yogurts. Currently, several yogurt manufacturers use probiotics in their products. However, very few are marketing their products to consumers from the probiotic angle. Among the yogurt brands highlighting the probiotic component, Jalna (Australia) has the largest market share followed by Paul's Valia (Parmalat Foods, Australia Pty Ltd). Within the fermented milk drink category, Yakult is the acknowledged leader. Chr. Hansen (Denmark) is the leading probiotic culture supplier to participants in various dairy food markets, with other prominent suppliers including DSM (Herleen, The Netherlands), Rhodia (France) and Danisco (Copenhagen, Denmark). Prebiotic ingredients are being used in dairy products principally as a solution to fat replacement and fibers, rather than for their prebiotic functionality. Whilst synbiotic products are available, they are not being positioned as such due to low levels of consumer awareness and understanding of synbiotics. A key to the future success of lactoceuticals will therefore lie in communicating more effectively with mainstream consumers while ensuring the same safety and innocuity that is associated with food products.

Expert opinion & five-year view

In order to aid the development of innovative lactoceuticals, the gap between the food and the pharmaceutical/cosmetics industry needs to be bridged. The food industry has been

relying on the nutritive aspects of their products and are now at the crossroads of exploiting the active principle of their products that have been acting in their products for years. In order to do so, the food industry will have to learn to work together with research and development providers, turn to research activities of functional nutrition and inspire themselves with the experimental approach applied in the pharmaceutical/cosmetics industry in order to dissect and identify active molecules and ingredients. We are already seeing some moves in that sense to achieve that goal. Nestlé and L'Oreal (Paris, France) have announced the creation of Laboratoires Innéov, a new joint venture, to launch the first cosmetic food containing a lactoceutical to help restore the firmness of the skin. This approach will be applicable to the area of lactoceuticals from both pharmaceutical companies and cosmetics groups – well-established industries with huge research and development budgets. Food industry participants could do well to consider joint ventures with companies from these other sectors, thus avoiding some of the potential competition for the development of lactoceuticals.

In the next 5 years, lactoceuticals with functional properties will witness the strongest growth among the large family of nutraceuticals and will gradually appear on the market.

From the consumers perspective, we will see major changes. Consumers are being increasingly informed on their needs for better nutrition which is dependent on age and their personal medical needs. In addition, physicians recommend a change in lifestyles and dietary habits to their patients. With this new trend, consumers will have the opportunity to choose functional foods including lactoceuticals adapted to their age, lifestyle and health status. Lactoceuticals will definitely play a role in the establishment of those new trends. Consumers will be better informed and willing to improve their health. Products such as lactoceuticals will be the solution to various health problems and potentially contribute to their prevention, thus leading to a reduction in healthcare and medication costs.

Key issues

- Since healthcare and medication costs are rapidly rising, there is a need to reduce costs.
- Preventative and soft medicine such as functional food and nutraceuticals have the potential to reduce costs.
- Lactoceuticals are a subclass of nutraceuticals and have multiple advantages that can benefit a situation of increasing healthcare and medications costs.
- The term 'lactoceutical' was proposed, defined and used in this review for the first time: 'Lactoceutical: a product comprising any milk proteins from various sources that are either intact or modified using soft treatments that have a superior nutritional value over current milk-based products and exhibit exceptional and scientifically proven health benefits.'

References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest

•• of considerable interest

- 1 Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. *Dietary Reference Intakes: Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D and Fluoride*. National Academy Press, Washington DC, USA (1999).
- 2 Holick MF. Vitamin D. In: *Modern Nutrition in Health and Disease. Ninth Edition*. Shils M, Olson J, Shike M, Ross AC (Eds). Williams and Wilkins, MD, USA (1999).
- 3 Arthur C, Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 279–289 (2002).
- Describes the potential of probiotics and is a nice introduction to this field.
- 4 Kaur IP, Chopra K, Saini A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15, 1–9 (2002).
- 5 Ha E, Zemel MB. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acid: mechanisms underlying health benefits for active people. *J. Nutr. Biochem.* 14, 251–258 (2003).
- 6 Schneeman BO. Gastrointestinal physiology and functions. *Br. J. Nutr.* 88(Suppl. 2), S159–S163 (2002).
- 7 Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, Braesco V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium 'The Intelligent Intestine'. *Am. J. Clin. Nutr.* 78(4), 675–683 (2003).
- 8 Matsuzaki T, Chin J. Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol. Cell Biol.* 78(1), 67–73 (2000).
- 9 Kano H, Mogami O, Uchida M. Oral administration of milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1037R-1 to DBA/1 mice inhibits secretion of proinflammatory cytokines. *Cytotechnology* 40, 67–73 (2002).
- 10 Teruya K, Yamashita M, Tominaga R *et al*. Fermented milk, Kefir-kefir enhances glucose uptake into insulin-responsive muscle cells. *Cytotechnology* 40, 107–116 (2002).
- 11 Takano T. Antihypertensive activity of fermented dairy products containing biogenic peptides. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82(1–4), 333–340 (2002).
- 12 Seppo L, Jauhainen T, Poussa T, Korpela R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 77(2), 326–330 (2003).
- Very good example of the potential of fermented milk. A simple product that can benefit many people.
- 13 Agarwal KN, Bhasin SK. Feasibility studies to control acute diarrhoea in children by feeding fermented milk preparations Actimel and Indian Dahi. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56(Suppl 4), S56–S59 (2002).
- 14 Gorbach SL. Probiotics and gastrointestinal health. *Am. J. Gastroenterol.* 95(Suppl. 1), S2–S4 (2000).
- Excellent overview of the relationship between the immune system, probiotics and gut health.
- 15 Agerholm-Larsen L, Bell ML, Grunwald GK, Astrup A. The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol: a meta-analysis of short-term intervention studies. *Eur. J. Clin. Nutr.* 54(11), 856–860 (2000).
- 16 Matar C, Valdez JC, Medina M, Rachid M, Perdigon G. Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its nonproteolytic variant. *J. Dairy Res.* 68(4), 601–609 (2001).
- 17 Kawase M, Hashimoto H, Hosoda M, Morita H, Hosono A. Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. *J. Dairy Sci.* 83(2), 255–263 (2000).
- 18 Steijns JM, van Hooijdonk AC. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *Br. J. Nutr.* 84(Suppl. 1), S11–S17 (2000).
- Lactoferrin is a potent and multifunctional protein that has a bright commercial future. Describes its various facets.
- 19 Kussendrager KD, van Hooijdonk AC. Lactoperoxidase: physicochemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *Br. J. Nutr.* 84(Suppl. 1), S19–S25 (2000).
- 20 Bounous G, Molson JH. The antioxidant system. *Anticancer Res.* 23(2B), 1411–1415 (2003).
- 21 Lonnerdal B, Lien EL. Nutritional and physiologic significance of α -lactalbumin in infants. *Nutr. Rev.* 61(9), 295–305 (2003).
- 22 Wolf RR. Regulation of muscle protein by amino acids. *J. Nutr.* 132, S3219–S3224 (2002).
- 23 See D, Mason S, Roshan R. Increased tumor necrosis factor α and natural killer cell (NK) function using an integrative approach in late stage cancers. *Immunol. Invest.* 31(2), 137–153 (2002).
- 24 Lefranc C. Prodiel TM F-200: an innovative stress-relieving ingredient. *Agro-Food Industry Hi-Tech* 13(4), 9–11 (2002).
- F200 is probably the most advanced active milk ingredient, this paper introduces its story and all the potential applications of the product.
- 25 Brody EP. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *Br. J. Nutr.* 84(Suppl. 1), S39–S46 (2000).
- 26 Pins JJ, Keenan JM. Hydrolyzed whey protein isolate BioZate1. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 16(Suppl. 1), 68 (2002).
- 27 Tucker KL. Dietary intake and bone status with aging. *Curr. Pharm. Des.* 9(32), 2687–2704 (2003).
- 28 Baro L, Fonolla J, Pena JL *et al*. n-3 Fatty acids plus oleic acid and vitamin supplemented milk consumption reduces total and LDL cholesterol, homocysteine and levels of endothelial adhesion molecules in healthy humans. *Clin. Nutr.* 22(2), 175–182 (2003).
- 29 Berner LA, O'Donnell JA. Functional foods and health claims legislation: applications to dairy products. *Int. Dairy J.* 355–362 (1998).
- 30 Hasler CM. Functional foods: benefits, concerns and challenges – a position paper from the American Council on Science and Health. *J. Nutr.* 132(12), 3772–3781 (2002).
- Good introduction of what is going on in terms of legislation on health claims. The reader will discover that the analysis of health claims is not an easy task.

Website

- 101 www.foodanddrinkeurope.com (Accessed March 2004)

Affiliations

- Pierre Lemieux, PhD
Vice president R&D Health/Technologie
Biolactis Inc., 531 Boul. Des Prairies, Building
18, Laval, PQ H7B 1B7, Canada
Tel.: +1 450 686 5811
Fax: +1 450 686 5501
plemieux@biolactis.com
Adjunct professor at the Institut National de
Recherche Scientifique – Institut Armand
Frappier
- Josée Beaulieu, MSc, PhD Student
Biolactis Inc., 531 Boul. Des Prairies, Building
18, Laval, Quebec, H7B 1B7, Canada
- Eric Simard, PhD Student
Biolactis Inc., 531 Boul. Des Prairies, Building
18, Laval, Quebec, H7B 1B7, Canada

Annexe 2. Whey proteins and peptides: Beneficial effects on immune health



Whey proteins and peptides: beneficial effects on immune health

Josée Beaulieu,
Claude Dupont
& Pierre Lemieux[†]

[†]Author for correspondence
Technologie Biolactis,
531 Blvd. Des Prairies,
Building 18, Laval,
Quebec, H7V 1B7, Canada
Tél.: +1 450 686 5811
Fax: +1 450 686 5501
plemieux@biolactis.com

Over the last decade, natural health products have been the subject of immense infatuation in the scientific community, in particular with immunologists. Numerous recent studies have demonstrated important effects on all facets of immunity – from the stimulation of innate and adaptive immunity, to an anti-inflammatory effect of these products. In many of these enhancing health products, whey proteins and whey peptides are present, which, for many years, have been well known for their benefits on energy, sport endurance, protection against cancers, and serum lipid-lowering effect. Recently, this class of product has gained interest from immunologists who support the ever increasing body of evidence regarding their beneficial effects on the immune system. This article will focus on studies showing immune effects associated with each whey protein and peptide.

Until recently, whey proteins have been mainly studied for their positive effects on endurance by increasing muscle protein balance during sport training [1]. Many studies have also demonstrated that whey proteins possess an excellent lowering effect on serum lipid levels and blood pressure [2]. The discovery of the antioxidant potential of whey protein products [3] was one of the principal studies demonstrating the potential health benefit of these products for cancer and the immune system. Subsequently, many studies have reported a protective effect against different types of cancer by the whey proteins including an important review by Bounous [4].

Currently, most research focuses on the effects whey proteins and peptides have on immune health and their protective roles in immune disorders. Whey is composed mainly of proteins as well as many peptides derived from these proteins. The proteins found in whey are principally β -lactoglobulin, α -lactalbumin, lactoferrin, immunoglobulin (Ig) and bovine serum albumin (BSA). Their biochemical properties, as well as their concentrations in milk and whey, are summarized in Table 1. All of these proteins and peptides possess specific effects on immunity. These effects will be discussed with relation to specific associated proteins or peptides, and are summarized in Table 2.

β -lactoglobulin

β -lactoglobulin is the most abundant protein found in whey, comprising between 55 and 65% of the total whey protein content. This protein possesses numerous physicochemical attributes such as acting as an emulsifier, as well as many reported health effects.

In 1985 Bounous and Kongshavn were among the first researchers to demonstrate an immunoenhancing effect of β -lactoglobulin [5]. They showed that the whey proteins (principally β -lactoglobulin and BSA) increase the number of antibody-forming cells in the spleen of mice immunized with trinitrophenylated ficoll. Subsequently, the team of Wong and colleagues demonstrated that the stimulatory effects of β -lactoglobulin on normal murine spleen cells are more intense than those observed with BSA [6]. The immune effects on murine spleen cells are postulated to be due to an increase in glutathione (GSH) production by splenocytes. This has been confirmed by the addition of *S*-(*n*-butyl)homocysteine sulfoxamine, an inhibitor of glutamylcysteine synthetase, which in this case, blocked the stimulatory effect [6].

Controversially, another study demonstrated that the observed effects of β -lactoglobulin on spleen cells to produce T-helper (Th)-cell 1 cytokines are due to endotoxin contamination [7]. This study was conducted with a commercial β -lactoglobulin product and utilization of a specific isolation technique led to the presence of an endotoxin in the preparation. However, the team of Wong and colleagues have proven that the effect observed with β -lactoglobulin is not due to endotoxin contamination but the utilization of polymixin B, a lipopolysaccharide (LPS) inhibitor [6]. The utilization of this LPS inhibitor markedly reduced the effect of LPS; however, it had no effect on β -lactoglobulin. This study confirms that the β -lactoglobulin really does possess an immunomodulatory effect. It is important to note that preparation is essential in the quality

Keywords: immune, inflammation, peptide, protein, whey

future
medicine part of fsg

Table 1. Specific properties of whey proteins.

Protein	MW (g/mol)	IP	Concentration			Other structural properties
			Milk (g/l)	Whey(g/l)	Whey (%)	
β -lactoglobulin	18,400	5.35–5.49	2.0–4.0	3.3	55–65	Presence of a hydrophobic region capable of binding to vitamin A and helping its absorption.
α -lactalbumin	14,200	4.2–4.5	1.0–1.5	1.2	15–25	Presence of a hydrophobic region that binds galactosyltransferase and aids lactose biosynthesis.
Lactoferrin	80,000	8.4–9.0	0.2	0.2	1–2	Presence of ferric ion binding sites, which permits Lf binding and the transport of iron – an important role in iron assimilation.
Immunoglobulin	80–900,000	5.5–8.3	0.4–1.0	0.5	10–15	Five categories of Igs: IgG1 (0.3–0.6 g/l), IgG2 (0.05–0.1 g/l), IgA (0.05–0.15 g/l), IgM (0.05–0.1 g/l) and IgE.
BSA	69,000	4.7–4.9	0.1–0.4	0.3	5–10	Important capabilities to bind fatty acids.

BSA: Bovine serum albumin; Ig: Immunoglobulin; IP: Isoelectric point; Lf: Lactoferrin; MW: Molecular weight. Adapted from [90–92].

and reliability of results, as demonstrated by Brix and colleagues [7]. An additional control should be included in the study to confirm its validity.

Peptides from β -lactoglobulin

Many studies have been conducted with specific peptides from β -lactoglobulin; however, due to the complex nature of the protein, some of the peptides derived from it are still unknown. Of the β -lactoglobulin peptides, four exhibit antimicrobial activities [8]. β -lactoglobulin is also a carrier of many small hydrophobic molecules, such as retinoic acid, a modulator of lymphocyte responses [9].

A peptide from β -lactoglobulin, known as β -lactotensin, has demonstrated an effect on the contraction of the ileum longitudinal muscle [10]. A study completed with β -lactotensin showed similar results – that this peptide possesses a stimulating effect on smooth muscle *in vitro* [11]. Smooth muscle is responsible for the contractility of hollow organs, such as blood vessels, the gastrointestinal tract, the bladder and the uterus. Many diseases, including allergy, asthma and atherosclerosis, are related to dysfunctions of smooth muscle. Although the role of smooth muscle cells is contraction, they also exhibit extensive phenotypic diversity during normal development, repair of vascular injury and in disease states [12]. The stimulating effect of β -lactotensin on smooth muscle provides information that this peptide can enhance general health.

β -lactoglobulin is the protein responsible for milk allergies in children (2–3% of children suffer from milk allergies); however, in 80% of cases allergy symptoms disappear before the age of 3 years [13]. It has been demonstrated that the peptides from β -lactoglobulin induce oral tolerance and consequently, diminish IgE production specific to β -lactoglobulin [14]. This observation suggests that the consumption of peptides from β -lactoglobulin possesses an important protective role against milk allergies.

α -lactalbumin

α -lactalbumin is the second major protein present in whey, accounting for 15 to 25% of the whey protein content. This protein is rich in essential amino acids and has a low immunogenicity, indicating that α -lactalbumin is a good nutrient for children [15]. It has also been shown that a diet supplemented with α -lactalbumin increases resistance against acute infection caused by *Escherichia coli* [16].

In the 1980s, many studies demonstrated an immunoenhancing effect of α -lactalbumin in mice [17,18]. Despite these studies, it is surprising to observe an absence of research on the immunomodulatory effects of α -lactalbumin. It has been clear since 1997 that α -lactalbumin possesses stimulatory effects. The production of IL-1 β by sheep macrophages issued from bronchoalveolar lavage is increased by the presence of this protein [19].

Table 2. Immunologic effects of whey proteins and peptides.

Whey fraction	Reported effect	Ref.
β-lactoglobulin (proteins)	Stimulatory effect on splenocytes	[5,6]
	Increase GSH	[3]
β-lactoglobulin (peptides)	Carrier of retinoic acid	[9]
	Contraction of ileum muscle	[10,11]
	Increase oral tolerance to whey	[14]
α-lactalbumin (proteins)	Increase IL-1α production by macrophages	[19]
	Induce apoptosis in tumor and immature cells	[20,21]
α-lactalbumin (peptides)	Modulation of B- and T-lymphocyte activities	[5,25]
	Stimulation of adherence and phagocytosis of macrophages	[22,23]
	Stimulation of oxidative burst response	[22]
Lactoferrin (proteins)	Inhibition of cytokines TNF-α, IL-1α and IFN-γ	[19,32,35,36]
	Anti-inflammatory effect on animal model	[33-36]
	Upregulation of cytokine IL-10	[35]
	Stimulatory effect on lymphocyte proliferation	[19]
	Regulatory effect on myelopoiesis	[38-40]
	Promote the differentiation of T- and B-lymphocytes	[42,43]
	Increase NK cells, CD8 ⁺ cells, CD4 ⁺ cells	[44,45,47]
	Bind to CpG and prevent stimulatory effect on B-cells	[37]
	Stimulation of mucosal immunity through Peyer's patches	[46,47]
Increase phagocytosis activity of neutrophils as well as IL-8	[50,51]	
Lactoferrin (peptides)	Increase phagocytosis activity of neutrophils as well as IL-8	[50,51]
	Bind to CpG and prevent stimulatory effect on B-cells	[37]
	Inhibition of IL-6 production by LPS	[53]
	Increase of apoptosis in leukemic cells lines via production of ROS by phagocytic cells	[54]
Immunoglobulins	Increase of GSH	[58]
	Activation of complement, increase of phagocytosis, prevent adhesion of microbes, neutralize viruses and toxins	[55]
BSAs	Increase of GSH	[3]
	Stimulatory effect on splenocytes	[5]
GMPs	Suppress proliferation of cells upon mitogens stimulation	[59-61]
	Stimulation of macrophages proliferation and phagocytosis	[62]

BSA: Bovine serum albumin; GSH: Glutathione; GMP: Glycomacropeptide; Ig: Immunoglobulin; IL: Interleukin; IFN: Interferon; LPS: Lipopolysaccharide; NK: Natural killer cell; ROS: Reactive oxygen species; TNF: Tumor necrosis factor.

The team of Svanborg and colleagues has identified a variant of α-lactalbumin similar to the modified α-lactalbumin found in the stomach of nursing children, which possess interesting immune effects [20,21]. This protein can protect against cancer by the induction of apoptosis in tumor and immature cells, but has no effect on healthy cells [21].

Peptides from α-lactalbumin

Hydrolyzed α-lactalbumin, which contains unidentified peptides, has demonstrated a modulation of B- as well as T-lymphocyte activities [5].

After this observation, research into the identification of peptides from α-lactalbumin as well as its associated immunomodulatory effects, have been undertaken.

An immunomodulatory tripeptide derived from α-lactalbumin has been discovered [22]. This tripeptide, glycyl-leucyl-phenylalanine (GLF), stimulates the adherence and phagocytosis of human monocytes and macrophages, apparently by a mechanism of binding to the specific receptors for GLF on these cells [22,23]. The same research team evaluated the properties of this tripeptide on human and rat

polymorphonuclear (PMN) cells. GLF increases the production of the superoxide anion by human PMNs, increasing the oxidative burst response in the presence of GLF. Phosphoinositide metabolism is also increased in the presence of GLF, which can be seen by the liberation of a second messenger, IP₃, leading to an enhancement in membrane fluidity [24]. Moreover, a study carried out with another peptide (Tyr-Gly-Gly) from α -lactalbumin revealed a stimulation of human peripheral blood lymphocytes in the presence of this peptide [25]. In relation to antimicrobial activities, Pelligrini and colleagues have identified that these three peptides from α -lactalbumin possess interesting antimicrobial activities [26].

Lactoferrin

Lactoferrin, an antioxidant glycoprotein with iron-binding properties, is the most studied of the whey proteins and also appears to be the best immunomodulator. The antioxidant capacity of lactoferrin is due to its iron-binding site that participates in the generation of hydroxyl radicals [27]. This iron-binding capacity is also partly responsible for its antimicrobial potential [28]. Lactoferrin is found in colostrums [29], mucosal secretions [30] and neutrophil granules [31]. The localization of lactoferrin in important sites implicated in acquiring immunity, suggests an important contribution of lactoferrin in immune health. In whey, the proportion of lactoferrin is 1 to 2%. Numerous studies on the roles of lactoferrin in immunity have been conducted. This paper will review the most significant observations reported to date.

Lactoferrin exhibits a known immunomodulatory potential by its capacity to act as both an immunosuppressive as well as an immunostimulatory agent. Certain studies revealed the anti-inflammatory potential of lactoferrin in some circumstances, while in others the immune status demonstrated its stimulatory potential.

Lactoferrin possesses an anti-inflammatory potential in part by inhibiting cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1 β , which are key inflammatory cytokines [32]. Many animal models demonstrate that lactoferrin can protect against inflammatory conditions. A study by Dial and colleagues shows that lactoferrin protects against gastritis induced by *Helicobacter felis* bacterium in mice [33]. Moreover, local administration of lactoferrin in inflamed joints of two different

arthritis models in mice shows a strong local anti-inflammatory effect not related to the reduction of the proinflammatory cytokine IL-6 [34]. The effect of this protein on arthritis has also been reported in another study in which lactoferrin protected against arthritis in rats induced by adjuvant administration in the right hind paw [35]. In this model, the protective effect against arthritis is due to a downregulation of the proinflammatory cytokine TNF- α and an upregulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 [35].

Lactoferrin also possesses the capacity to inhibit atopic contact dermatitis induced by oxazolone. In this study, lactoferrin applied topically prior to oxazolone sensitization prevents, in a dose-dependent manner, the migration of Langerhan's cells into the lymph nodes and subsequently activates cytotoxic T-cells and the accumulation of dendritic cells in inflamed sites. The mechanism of action seems to be the inhibition of TNF- α production by keratinocytes – the cytokine responsible for delivering the activation signal to Langerhan's cells [36]. Lactoferrin has the ability to bind to the CpG motifs via charge-charge interactions of the N-terminal sequence of lactoferrin. This binding of CpG on lactoferrin inhibits the stimulatory effects of these motifs on immune cells [37]. The binding of CpG and LPS suggests another mechanism for the anti-inflammatory effect of lactoferrin.

The immunosuppressive potential of lactoferrin has also been observed in lymphocyte cells as it demonstrates an inhibitory effect on lymphocyte proliferation upon stimulation by mitogens, as well as on IFN- γ production by these cells [19]. Other studies have reported the regulatory potential of lactoferrin on myelopoiesis by its suppressive activities on many cells including lymphocytes, macrophages and monocytes [38–40]. These processes are regulated by cytokines, indicating that lactoferrin could act as a regulatory nutrient by controlling cytokine production. The potential of lactoferrin to modulate immunity via regulation of cytokines has previously been demonstrated [41].

Lactoferrin also exhibits an immunostimulatory potential. It has been demonstrated that this protein promotes the differentiation of T- and B-lymphocytes [42,43]. The incubation of immature T-lymphocytes in the presence of lactoferrin allows for the differentiation of these cells in CD4⁺ helper T-cells and the immune response of sheep red blood cells increases [42]. Natural killer (NK) cells as well as CD8⁺ T-cells

have also increased in circulating cells after consumption of lactoferrin. This observation reveals a protective role in the control of tumor metastases since NK and CD8⁺ T-cells have important role in tumor inhibition [44,45]. Debbabi and colleagues have investigated the immune responses induced by repeated oral administration of lactoferrin in mice. IgA and IgG secretions are enhanced in the Peyer's patches and spleen from lactoferrin-fed mice but not in serum [46]. Wang and colleagues have also confirmed these observations in a study in which the CD4⁺, CD8⁺, asialoGM1⁺ (marker of NK cells), IgA⁺ and IgM⁺ B-cells have increased in the small intestine of mice treated with lactoferrin [47]. In this study, lactoferrin enhanced production of IL-18, IFN- γ and caspase-1, leading to an important stimulation of intestinal immunity. These results suggested that lactoferrin could act as an immunostimulatory factor on the mucosal immune system [46]. Immune effects occur as a result of the action through gut-associated lymphoid tissue (GALT), where lactoferrin may bind to epithelial cells or interact with M-cells in the Peyer's patches. These interactions of GALT may lead to the production of cytokines being released in the circulation and act systemically on circulating leukocytes.

Controversially, lactoferrin shows an absence of stimulation in B- or T-cells or in cytokine production (IL-6, TNF- α , INF- γ) in Peyer's patches of newborn mice [48]. The consumption of nutrients by newborns in these studies probably leads to oral tolerance due to the supposed absence of early consumption of whey proteins prior to the experiment. The immune system of newborns was not completely developed and they do not have effective cells for the development of the same immunomodulation as an adult mouse [49].

The phagocytic activity of human neutrophils is increased by the presence of lactoferrin. This activation appears to be a result of the specific binding of lactoferrin to neutrophils [50]. Following binding, lactoferrin is thought to be transported into the nucleus where it activates gene expressions responsible for the activation of the phagocytosis mechanism. It is also demonstrated that lactoferrin stimulates the production of IL-8 (a chemokine implicated in the activation of neutrophil activities) from human neutrophils [51]. In contrast, consumption of lactoferrin by newborn calves does not seem to change the production of the superoxide by PMN cells [52]. However, this

study was completed with newborn calves that received lactoferrin only over a 9-day period; it is possible that the immunity of these young animals was not stimulated to activate their PMN cells over such a brief time period.

Peptides from lactoferrin

The main lactoferrin-derived peptide studied is lactoferricin, which corresponds to 25 amino acids from its N-terminus. This peptide appears to be responsible for the majority of immune benefits reported for lactoferrin. The activation of phagocytosis, as well as the production of IL-8 from neutrophils when treated with lactoferrin, is also observed when treated with the lactoferricin fraction [50,51]. It is mentioned above that the production of IL-18, IFN- γ and caspase-1 is increased by lactoferrin; a response also observed with lactoferricin [47]. Lactoferricin is capable of binding CpG motifs and preventing their immunostimulatory effects on B-cells [37], suggesting a potential anti-inflammatory role of lactoferricin similar to lactoferrin. Moreover, the lactoferricin peptide has been found to suppress the IL-6 response in a monocytic cell line upon stimulation by lipopolysaccharide [53].

Lactoferricin demonstrates an induction of apoptotic in human monocytic leukemic cells in a dose- and time-dependent manner. The apoptosis effect of lactoferricin remains present even if various cytokines and mitogens are added. This effect is correlated with high levels of intracellular reactive oxygen species (ROS), suggesting that the apoptosis-inducing activity is related to the production of intracellular ROS by phagocytic cells [54].

Immunoglobulins

IgG are present in whey at a rate of approximately 10%. IgG1 is the major Ig found in whey (~75%), followed by IgM, IgA and IgG2. In general, the Igs possess several immune benefits. The principal role of Igs is to defend organisms against pathogens and viruses. They are responsible for the activation of complement, increasing phagocytosis by leukocytes, preventing adhesion of microbes and neutralizing viruses and toxins [55]. All of these activities can likely be attributed to whey Igs. Effectively, Roos and colleagues have demonstrated that ingested Igs retain these immunological activities in the human ileum [56]. It has also been demonstrated that an Ig-like receptor isolated from milk inhibits HIV integrase as well as HIV protease [57].

The immunoenhancing effects often demonstrated in animals fed with whey proteins can be attributed in part to an increase in intracellular glutathione [58]. A study of animals fed with defined whey products has demonstrated that the product containing a higher proportion of Igs (and BSA) exhibited a better GSH-enhancing effect [3]. GSH is an intracellular antioxidant, which requires cysteine, glycine and glutamine for its synthesis. It is important to note that the Igs possess high levels of cysteine and glutamine.

Bovine serum albumine

BSA is a good source of essential amino acids and is found in approximately 5 to 10% of the whey protein content. Only a few studies have demonstrated the immunologic effects of BSA. GSH production increases when animals are fed with a whey diet containing a higher proportion of BSA. This explains the positive effect of BSA since GSH is responsible for some of the immune benefits observed with whey products [3]. As with the Igs, serum albumin fractions contain glutamine and cysteine amino acids that provide an enhancing effect on GSH production.

Moreover, as with β -lactoglobulin, BSA increases the amount of antibody-forming cells in the spleen of mice immunized with trinitrophenylated ficoll [5].

Glycomacropeptide

Glycomacropeptide (GMP) is released during the digestion of casein with the chymosin enzyme has been found in whey at a rate of approximately 10%. This is the only casein-derived peptide to be found in whey; all of the other peptides derived from casein remain in the cheese fraction. The GMP is present in whey only when chymosin is used during the cheese fabrication process. GMP is known to inhibit proliferation of mouse splenocytes as well as in cells from Peyer's patches isolated from a rabbit upon stimulation with LPS and phytohemagglutinin (PHA) [59-61]. These results indicate that this peptide downregulates the immune system by suppressing T-lymphocytes (stimulated by PHA) as well as B-lymphocytes (stimulated by LPS). Li and Mine demonstrated that GMP is a potent immunoenhancer of macrophage proliferation as well as phagocytic activity *in vitro* [62]. The second part of this study demonstrated that the immunomodulatory effects of GMP are essentially due to sialic acid. Effectively, when enzymatic treatment removes this fragment, the effects are abolished.

Other effects of whey proteins

The majority of the studies concerning the immunomodulatory potential of whey proteins used whey directly and not one of individual whey proteins; the effects are therefore associated with whey proteins in general and not a specific protein.

The immunoenhancing effect of whey proteins on the formation of specific antibodies is well documented [5,63-66]. For example, one study demonstrated that mice fed with whey protein concentrate (WPC) express an elevated level of antibodies after the administration of different vaccines via different routes [66]. The same immunoenhancing effect was observed by Wong and Watson, when they reported higher concentrations of anti-ovalbumin antibodies in the presence of whey proteins [65]. The same study also demonstrated an increase in cell-mediated immunity after a period of 5 weeks in contrast with another study [5]. This difference; however may be as a result of different whey sources as well as the dose and duration of feeding. Variable effects of whey can be attributed to the whey source [67]. It is also demonstrated that whey enhances the proliferation of non-stimulating (mitogens) splenocytes [68].

A hypothesis suggests that whey proteins may act via the GALT system for the production of antibodies. This hypothesis is supported by results demonstrating that WPC increases the antibody response in the intestinal tract of mice upon immunization with ovalbumin [69].

Roth and colleagues demonstrated that ultra-filtered bovine whey increases the *in vitro* neutrophil functions of cattle cells as well as cytochromeC reduction in cells of dexamethasone-treated cattle [70]. This finding indicates that whey proteins increase the oxidative metabolism of cattle treated with dexamethasone. However, in this study, the whey came from hyperimmunized cows and it is possible that these effects are due to the cytokines present and not by the whey proteins.

Until now, the only immunostimulating properties of whey proteins have been discussed; however, some studies indicate that whey can be an immunosuppressive agent in some circumstances. *In vitro* studies show an immunosuppression of T- and B-lymphocyte proliferation upon stimulation with mitogens [19,71,72]. Whey proteins also show an immunoregulatory effect in spleen cells, since the activation of these cells is downregulated by oral administration of whey [73]. The increase

in transforming growth factor (TGF)- β production in cells after whey treatment may explain this regulation. TGF- β is a cytokine secreted during the tolerance induction and is responsible for the downregulation against food antigens [49]. These results show that whey proteins might be a good nutritive supplement due to their capabilities to modulate immunity, which may help in many different immune diseases.

Other effects of whey peptides

Some effects of whey peptides have been reported; however, the characterization of these peptides have not yet been investigated, thus the protein associated with the effective peptides is unknown. A hydrolyzed whey protein isolate composed of β -lactoglobulin, α -lactalbumin and GMP has been shown to possess a stimulatory effect on lymphocyte proliferation *in vitro* [68]. Another peptide, a glycoposphopeptide isolated from cheese whey, has demonstrated a mitogenic activity on splenocytes [74]. It has also been demonstrated that the peptides issued from whey and milk possess a good immunostimulatory effect on keratinocyte growth *in vitro* [75].

Some whey peptides also possess an inhibitory effect on the angiotensin-converting enzyme (ACE) [76]. ACE is responsible for inactivation of bradykinin. Bradykinin exhibits an essential role in inflammatory defence by the stimulation of macrophage and cytokine production [55]. Consequently, the peptides that act as ACE inhibitors stimulate the immune system via macrophage activation.

As mentioned previously, β -lactoglobulin is principally responsible for milk allergies in children. It has been postulated that peptides from β -lactoglobulin diminish the allergic reaction to this protein [14]. Many studies have also demonstrated a preventive role against milk allergies from hydrolyzed whey proteins [77–79].

Moreover, many other constituents in milk and whey are known to possess immunomodulatory effects, such as cytokines, growth factors, enzymes and hormones [80–82]. A growth factor derived from whey has been shown to have a protective effect in a colitis animal model [83,84]. Francis and colleagues have demonstrated that a growth factor isolated from whey improved the growth rate of cells such as epithelials and fibroblasts [85,86]. These results led them to postulate that whey could be an interesting product against many diseases, not only due to the protein or peptide content.

Expert commentary & outlook

It has been known for many years that the consumption of nutraceuticals is important in maintaining general health. Statistics confirming the important rise in the consumption of nutraceutical products by the general population show that this is indeed the case [87,88]. For example, some reviews have already demonstrated the immunologic effects of milk-derived products such as yogurt [89].

This article, which emphasizes the reported immune effects of whey proteins and derived peptides, demonstrates an important therapeutic potential of whey products, not only for maintaining good general health but also in guarding against many immune diseases, such as inflammatory disorders and autoimmune diseases. All the proteins and peptides present in whey possess an immunomodulatory potential, in both innate and acquired immunity, which provide an excellent mechanism of defence against all infections. The potential of enhancing GSH, NK cells, cytotoxic T-cells and the phagocytic process, leads to an enhancement in its capacity to defend against cancer.

Moreover, it is now reported that lactoferrin (and lactoferricin) provides whey with an important effect against bacterial and autoimmune inflammatory diseases. Many studies have proven that whey (and especially lactoferrin) plays a protective role against gastritis, asthma, colitis, arthritis and atopic contact dermatitis. The anti-allergy properties of whey with regard to milk reactions were also reported in a study involving peptides derived from β -lactoglobulin. These peptides appear to protect against allergies by the stimulation of oral tolerance. This observation is very important, as it presents an encouraging perspective that children, having consumed whey early on in life, can consume milk (an important nutrient) without the onset of allergies.

Whey products appear to have essential properties and could be used in the treatment of many diseases. Their effects could be comparable with the effects observed with many medicines and drugs, whilst still acting as a unique natural product. Further studies are needed to compare whey products with medicines in the treatment and prevention of disease.

These products or derived products from part of a future solution in obtaining and maintaining a healthy general immune system and in providing a natural, nutritive and non-chemical supplement against numerous diseases and immune disorders.

Highlights

- The most important immune effect reported for the majority of whey proteins and peptides is the stimulation of innate immunity via an increase in macrophage activity and interleukin-8 production.
- Lactoferrin is the most studied of the whey proteins and its immune effects are diverse and dependent on the conditions for which it is used. For example, lactoferrin stimulates innate immunity in some conditions and could also exert anti-inflammatory effects in others.
- Lactoferrin also exhibits effect on mucosal immunity via stimulation of Peyer's patches. This mucosal immunomodulation could be responsible for multiple reported systemic effects.
- The ability of whey proteins and peptides to enhance glutathione, natural killer cells, cytotoxic T-cells and the phagocytic process, fortifies the immune system against the development of cancers.
- Many studies demonstrated that whey plays a protective role against diseases such as gastritis, asthma, colitis, arthritis and atopic contact dermatitis.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as of interest (*) or of considerable interest (**) to readers.

1. Tipton KD, Elliott TA, Cree MG, Wolf SE, Sanford AP, Wolfe RR. Ingestion of casein and whey proteins results in muscle anabolism after resistance exercise. *Med. Sci Sports Exerc.* 36(12), 2073–2081 (2004).
2. Kawase M, Hashimoto H, Hosoda M, Morita H, Hosono A. Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. *J. Dairy Sci.* 83(2), 255–263 (2000).
3. Bounous G, Gold P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. *Clin. Invest. Med.* 14(4), 296–309 (1991).
- **Good introduction to GSH properties and its role in immunity as well as the effect of whey on GSH production.**
4. Bounous G, Molson JH. The antioxidant system. *AntiCancer Res.* 23(2B), 1411–1415 (2003).
5. Bounous G, Kongshavn PA. Differential effect of dietary protein type on the B-cell and T-cell immune responses in mice. *J. Nutr.* 115(11), 1403–1408 (1985).
6. Wong KF, Middleton N, Montgomery M, Dey M, Carr RI. Immunostimulation of murine spleen cells by materials associated with bovine milk protein fractions. *J. Dairy Sci.* 81(7), 1825–1832 (1998).
7. Brix S, Bovetto L, Fritsche R, Barkholt V, Frokiaer H. Immunostimulatory potential of β -lactoglobulin preparations: effects caused by endotoxin contamination. *J. Aller. Clin. Imm.* 112(6), 1216–1222 (2003).
8. Pellegrini A, Dettling C, Thomas U, Hunziker P. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1526(2), 131–140 (2001).
9. Guimont C, Marchall E, Girardet JM, Linden G. Biologically active factors in bovine milk and dairy by-products: influence on cell culture. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37(4), 393–410 (1997).
10. Yamauchi K. Biologically functional proteins of milk and peptides derived from milk proteins. *International Dairy Federation Bulletin* 272, 51–58 (1992).
11. Pihlanto-Leppala A, Paakkari I, Rinta-Koski M, Antila P. Bioactive peptide derived from *in vitro* proteolysis of bovine β -lactoglobulin and its effect on smooth muscle. *J. Dairy Res.* 64(1), 149–155 (1997).
12. Yoshida T, Owens GK. Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. *Circ Res.* 96(3), 280–291 (2005).
13. Host A. Frequency of cow's milk allergy in childhood. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 89(6 Suppl. 1), 33–37 (2002).
14. Pecquet S, Bovetto L, Maynard F, Fritsche R. Peptides obtained by tryptic hydrolysis of bovine β -lactoglobulin induce specific oral tolerance in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105(3), 514–521 (2000).
- **Shows that peptides from β -lactoglobulin can protect against allergies to the protein.**
15. Matsumoto H, Shimokawa Y, Ushida Y, Toida T, Hayasawa H. New biological function of bovine α -lactalbumin: protective effect against ethanol- and stress-induced gastric mucosal injury in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65(5), 1104–1111 (2001).
16. Bruck WM, Kelleher SL, Gibson GR, Nielsen KE, Chatterton DEW, Lonnerdal B. rRNA probes used to quantify the effects of glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation on the predominant groups of intestinal bacteria of infant rhesus monkeys challenged with enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Ped. Gastr. Nut.* 37(3), 273–280 (2003).
17. Bounous G, Stevenson MM, Kongshavn PA. Influence of dietary lactalbumin hydrolysate on the immune system of mice and resistance to salmonellosis. *J. Infect. Dis.* 144(3), 281 (1981).
18. Bounous G, Letourneau L, Kongshavn PA. Influence of dietary protein type on the immune system of mice. *J. Nutr.* 113(7), 1415–1421 (1983).
19. Wong CW, Seow HF, Husband AJ, Regester GO, Watson DL. Effects of purified bovine whey factors on cellular immune functions in ruminants. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 56(1–2), 85–96 (1997).
20. Hakansson A, Andreasson J, Zhivotovsky B, Karpman D, Orrenius S, Svanborg C. Multimeric α -lactalbumin from human milk induces apoptosis through a direct effect on cell nuclei. *Exp. Cell Res.* 246(2), 451–60 (1999).
21. Svensson M, Hakansson A, Mossberg AK, Linse S, Svanborg C. Conversion of α -lactalbumin to a protein inducing apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(8), 4221–6 (2000).
22. Gattegno L, Migliore-Samour D, Saffar L, Jolles P. Enhancement of phagocytic activity of human monocytic macrophagic cells by immunostimulating peptides from human casein. *Immunol. Lett.* 18(1), 27–31 (1988).
23. Jaziri M, Migliore-Samour D, Casabianca-Pignede MR, Keddad K, Morgat JL, Jolles P. Specific binding sites on human phagocytic blood cells for Gly-Leu-Phe and Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr, immunostimulating peptides from human milk proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1160(3), 251–261 (1992).
- **Molecular mechanism by which peptides can exert their effects on immune cells.**
24. Migliore-Samour D, Roch-Arveiller M, Tissot M *et al.* Effects of tripeptides derived from milk proteins on polymorphonuclear oxidative and phosphoinositide metabolisms. *Biochem. Pharmacol.* 44(4), 673–680 (1992).

25. Kayser H, Meisel H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Lett.* 383(1–2), 18–20 (1996).
26. Pellegrini A, Thomas U, Bramaz N, Hunziker P, von Fellenberg R. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α -lactalbumin molecule. *Biochim. Biophys. Acta.* 1426(3), 439–448 (1999).
 - Shows antimicrobial activities of peptides isolated from α -lactalbumin.
27. Baldwin DA, Jenny ER, Aisen P. The effect of human serum transferrin and milk lactoferrin on hydroxyl radical formation from superoxide and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 259(21), 13391–13394 (1984).
28. Bezwoda WR, Mansoor N. Lactoferrin from human breast milk and from neutrophil granulocytes. Comparative studies of isolation, quantitation, characterization and iron binding properties. *Biomed. Chromatogr.* 3(3), 121–126 (1989).
29. Masson PL, Heremans JF. Lactoferrin in milk from different species. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 39(1), 119–129 (1971).
30. Masson PL, Heremans JF, Ferin J. Presence of an iron-binding protein (lactoferrin) in the genital tract of the human female I. Its immunohistochemical localization in the endometrium. *Fertil. Steril.* 19(5), 679–689 (1968).
31. Masson PL, Heremans JF, Schonke E. Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J. Exp. Med.* 130(3), 643–658 (1969).
32. Machnicki M, Zimecki M, Zagulski T. Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor- α and interleukin-6 *in vivo*. *Int. J. Exp. Pathol.* 74(5), 433–439 (1993).
33. Dial EJ, Romero JJ, Headon DR, Lichtenberger LM. Recombinant human lactoferrin is effective in the treatment of *Helicobacter felis*-infected mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 52(12), 1541–1546 (2000).
34. Guillen C, McInnes IB, Vaughan D, Speekenbrink AB, Brock JH. The effects of local administration of lactoferrin on inflammation in murine autoimmune and infectious arthritis. *Arthritis Rheum.* 43(9), 2073–2080 (2000).
35. Hayashida K, Kaneko T, Takeuchi T, Shimizu H, Ando K, Harada E. Oral administration of lactoferrin inhibits inflammation and nociception in rat adjuvant-induced arthritis. *J. Vet. Med. Sci.* 66(2), 149–154 (2004).
 - Describes mechanism of lactoferrin exerting its anti-inflammatory activity against arthritis.
36. Kimber I, Cumberbatch M, Dearman RJ, Headon DR, Bhushan M, Griffiths CE. Lactoferrin: influences on Langerhans cells, epidermal cytokines, and cutaneous inflammation. *Biochem. Cell Biol.* 80(1), 103–107 (2002).
 - Utilization of lactoferrin by topical contact instead of orally.
37. Britigan BE, Lewis TS, Waldschmidt M, McCormick ML, Krieg AM. Lactoferrin binds CpG-containing oligonucleotides and inhibits their immunostimulatory effects on human B-cells. *J. Immunol.* 167(5), 2921–2928 (2001).
38. Broxmeyer HE, DeSousa M, Smithyman A *et al.* Specificity and modulation of the action of lactoferrin, a negative feedback regulator of myelopoiesis. *Blood* 55(2), 324–333 (1980).
39. Bagby GC, Jr., Rigas VD, Bennett RM, Vandenberg AA, Garewal HS. Interaction of lactoferrin, monocytes, and T-lymphocyte subsets in the regulation of steady-state granulopoiesis *in vitro*. *J. Clin. Invest.* 68(1), 56–63 (1981).
40. Bagby GC, Jr. Regulation of granulopoiesis: the lactoferrin controversy. *Blood Cells* 15(2), 386–399 (1989).
41. Crouch SP, Slater KJ, Fletcher J. Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. *Blood* 80(1), 235–240 (1992).
42. Zimecki M, Mazurier J, Machnicki M, Wiczorek Z, Montreuil J, Spik G. Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4-CD8- murine thymocytes. *Immunol. Lett.* 30(1), 119–123 (1991).
43. Zimecki M, Mazurier J, Spik G, Kapp JA. Human lactoferrin induces phenotypic and functional changes in murine splenic B-cells. *Immunology* 86(1), 122–127 (1995).
44. Sekine K, Ushida Y, Kuhara T *et al.* Inhibition of initiation and early stage development of aberrant crypt foci and enhanced natural killer activity in male rats administered bovine lactoferrin concomitantly with azoxymethane. *Cancer Letter* 121(2), 211–216 (1997).
45. Iigo M, Kuhara T, Ushida Y, Sekine K, Moore MA, Tsuda H. Inhibitory effects of bovine lactoferrin on colon carcinoma 26 lung metastasis in mice. *Clin. Exp. Metastasis* 17(1), 35–40 (1999).
46. Debbabi H, Dubarry M, Rautureau M, Tome D. Bovine lactoferrin induces both mucosal and systemic immune response in mice. *J. Dairy Res.* 65(2), 283–293 (1998).
 - Shows the effect on mucosal immunity from lactoferrin consumption.
47. Wang WP, Iigo M, Sato J, Sekine K, Adachi I, Tsuda H. Activation of intestinal mucosal immunity in tumor-bearing mice by lactoferrin. *Jpn. J. Cancer Res.* 91(10), 1022–1027 (2000).
48. Griffiths EA, Duffy LC, Schanbacher FL *et al.* *In vivo* effects of bifidobacteria and lactoferrin on gut endotoxin concentration and mucosal immunity in balb/c mice. *Dig. Dis. Sci.* 49(4), 579–589 (2004).
49. Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol. Today* 18(7), 335–343 (1997).
50. Miyauchi H, Hashimoto S, Nakajima M, Shinoda I, Fukuwatari Y, Hayasawa H. Bovine lactoferrin stimulates the phagocytic activity of human neutrophils: identification of its active domain. *Cell. Immunol.* 187(1), 34–37 (1998).
51. Shinoda I, Takase M, Fukuwatari Y, Shimamura S, Koller M, Konig W. Effects of lactoferrin and lactoferricin on the release of interleukin-8 from human polymorphonuclear leukocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60(3), 521–523 (1996).
52. Dawes ME, Lakritz J, Tyler JW *et al.* Effects of supplemental lactoferrin on serum lactoferrin and IgG concentrations and neutrophil oxidative metabolism in Holstein calves. *J. Vet. Int. Med.* 18(1), 104–108 (2004).
53. Mattsby-Baltzer I, Roseanu A, Motas C, Elverfors J, Engberg I, Hanson LA. Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells. *Pediatr. Res.* 40(2), 257–262 (1996).
54. Yoo YC, Watanabe R, Koike Y *et al.* Apoptosis in human leukemic cells induced by lactoferricin, a bovine milk protein-derived peptide: involvement of reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237(3), 624–628 (1997).
55. Janeway CA, Travers P. *Immunobiologie (2nd Edition)*. De Boeck et Larclier, Paris, France, (1996).
56. Roos N, Mahe S, Benamouzig R, Sick H, Rautureau J, Tome D. ¹⁵N-labeled immunoglobulins from bovine colostrum are partially resistant to digestion in human intestine. *J. Nutr.* 125(5), 1238–1244 (1995).
57. Ng TB, Ye XY. A polymeric immunoglobulin receptor-like milk protein with inhibitory activity on human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36(11), 2242–2249 (2004).
58. Bounous G, Batist G, Gold P. Immunoenhancing property of dietary whey protein in mice: role of glutathione. *Clin. Invest. Med.* 12(3), 154–161 (1989).

59. Otani H, Monnai M, Hosono A. Bovine kappa-casein as inhibitor of the proliferation of mouse splenocytes induced by lipopolysaccharide stimulation. *Milchwissenschaft* 47, 512–515 (1992).
60. Otani H, Hata I. Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes and rabbit Peyer's patch cells by bovine milk caseins and their digests. *J. Dairy Res.* 62(2), 339–348 (1995).
61. Otani H, Monnai M, Kawasaki Y, Kawakami H, Tanimoto M. Inhibition of mitogen-induced proliferative responses of lymphocytes by bovine κ -caseinoglycopeptides having different carbohydrate chains. *J. Dairy Res.* 62(2), 349–357 (1995).
62. Li EW, Mine Y. Immunoenhancing effects of bovine glycomacropptide and its derivatives on the proliferative response and phagocytic activities of human macrophagelike cells, U937. *J. Agric. Food. Chem.* 52(9), 2704–2708 (2004).
63. Bounous G, Shenouda N, Kongshavn PA, Osmond DG. Mechanism of altered B-cell response induced by changes in dietary protein type in mice. *J. Nutr.* 115(11), 1409–1417 (1985).
64. Bounous G, Kongshavn PA, Gold P. The immunoenhancing property of dietary whey protein concentrate. *Clin. Invest. Med.* 11(4), 271–278 (1988).
65. Wong CW, Watson DL. Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. *J. Dairy Res.* 62(2), 359–368 (1995).
66. Low PPL, Rutherford KJ, Gill HS, Cross ML. Effect of dietary whey protein concentrate on primary and secondary antibody responses in immunized BALB/c mice. *Int. Immunopharmacol.* 3(3), 393–401 (2003).
- Describes the potential of whey to act as an oral adjuvant in vaccination.
67. Middleton N, Reid JR, Coolbear T, Jelen P. Proliferation and intracellular glutathione in Jurkat T-cells with concentrated whey protein products. *Int. Dairy J.* 13(7), 565–573 (2003).
68. Mercier A, Gauthier SF, Fliss L. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. *Int. Dairy J.* 14(3), 175–183 (2004).
69. Low PPL, Rutherford KJ, Cross ML, Gill HS. Enhancement of mucosal antibody responses by dietary whey protein concentrate. *Food Agric. Imm.* 13, 255–264 (2001).
70. Roth JA, Frank DE, Weighner P, Weighner M. Enhancement of neutrophil function by ultrafiltered bovine whey. *J. Dairy Sci.* 84(4), 824–829 (2001).
71. Otani H, Odashima M. Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes by lacto- and ovotransferrins. *Food Agric. Imm.* 9, 193–201 (1997).
72. Cross ML, Gill HS. Modulation of immune function by a modified bovine whey protein concentrate. *Immunol. Cell. Biol.* 77(4), 345–350 (1999).
73. Penttila IA, Zhang MF, Bates E, Register G, Read LC, Zola H. Immune modulation in suckling rat pups by a growth factor extract derived from milk whey. *J. Dairy Res.* 68(4), 587–599 (2001).
74. Yun SS, Sugita-Konishi Y, Kumagai S, Yamauchi K. Isolation of mitogenic glycoposphopeptides from cheese whey protein concentrate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60(3), 429–433 (1996).
75. Amiot J, Germain L, Turgeon S, Lemay M, OrySalam C, Auger FA. Peptides from milk protein hydrolysates to improve the growth of human keratinocytes in culture. *Int. Dairy J.* 14(7), 619–626 (2004).
76. Murakami M, Tonouchi H, Takahashi R *et al.* Structural analysis of a new antihypertensive peptide (β -lactosin B) isolated from a commercial whey product. *J. Dairy Sci.* 87(7), 1967–1974 (2004).
77. Han YS, Park HY, Ahn KM, Lee JS, Choi HM, Lee SI. Short-term effect of partially hydrolyzed formula on the prevention of development of atopic dermatitis in infants at high risk. *J. Korean Med. Sci.* 18(4), 547–551 (2003).
- Clinical study that proves that hydrolyzed whey formula can protect against allergies.
78. Tanabe S, Tesaki S, Watanabe J, Fukushi E, Sonoyama K, Kawabata J. Isolation and structural elucidation of a peptide derived from Edam cheese that inhibits β -lactoglobulin transport. *J. Dairy Sci.* 86(2), 464–468 (2003).
79. Peng HJ, Su SN, Tsai JJ, Tsai LC, Kuo HL, Kuo SW. Effect of ingestion of cow's milk hydrolyzed formulae on whey protein-specific Th2 immune responses in naive and sensitized mice. *Clin. Exp. Allergy* 34(4), 663–670 (2004).
80. Grosvenor CE, Picciano MF, Baumrucker CR. Hormones and growth factors in milk. *Endocr. Rev.* 14(6), 710–728 (1993).
81. Garofalo RP, Goldman AS. Cytokines, chemokines, and colony-stimulating factors in human milk: the 1997 update. *Biol. Neonate* 74(2), 134–142 (1998).
82. Rowlands JC, He L, Hakkak R, Ronis MJ, Badger TM. Soy and whey proteins downregulate DMBA-induced liver and mammary gland CYP1 expression in female rats. *J. Nutr.* 131(12), 3281–3287 (2001).
83. Procaccino F, Reinshagen M, Hoffmann P *et al.* Protective effect of epidermal growth factor in an experimental model of colitis in rats. *Gastroenterology* 107(1), 12–17 (1994).
84. Porter SN, Howarth GS, Butler RN. An orally administered growth factor extract derived from bovine whey suppresses breath ethane in colitic rats. *Scand. J. Gastroenterol.* 33(9), 967–974 (1998).
85. Francis GL, Register GO, Webb HA, Ballard FJ. Extraction from cheese whey by cation-exchange chromatography of factors that stimulate the growth of mammalian cells. *J. Dairy Sci.* 78(6), 1209–1218 (1995).
86. Rogers ML, Belford DA, Francis GL, Ballard FJ. Identification of fibroblast growth factors in bovine cheese whey. *J. Dairy Res.* 62(3), 501–507 (1995).
87. Hilliam M. The market for functional foods. *Int. Dairy J.* 8, 349–353 (1998).
88. Milner JA. Functional foods: the US perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(6 Suppl), 1654S–1659S (2000).
89. Meydani SN, Ha WK. Immunologic effects of yogurt. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(4), 861–872 (2000).
90. de Wit JN. Marshall Rhone-Poulenc Award Lecture. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J. Dairy Sci.* 81(3), 597–608 (1998).
- Good overview of the characteristics of the different whey proteins.
91. Marshall KR, Harper WJ. Trends in utilization of whey and whey derivatives. *Bulletin of the International Dairy Federation* 233, 21–32 (1988).
92. Cayot P, Lorient D. *Structures et technofonctions des protéines du lait*. Arilait Recherches, Paris, France, 37–182 (1998).

Affiliations

Josée Beaulieu, MSc.
 Institut National de la Recherche Scientifique,
 Institut Armand-Frappier,
 531 Blvd. Des Prairies, Laval,
 Quebec, H7V 1B7, Canada
 Claude Dupont, PhD
 Institut National de la Recherche Scientifique,
 Institut Armand-Frappier,
 531 Blvd. Des Prairies, Laval,
 Quebec, H7V 1B7, Canada
 Pierre Lemieux, PhD
 Technologie Biolactis, 531 Blvd. Des Prairies,
 Building 18, Laval, Quebec, H7V 1B7, Canada
 Tel.: +1 450 686 5811
 Fax: +1 450 686 5501
 plemieux@biolactis.com

**Annexe 3. Immunomodulation by a malleable matrix
composed of fermented whey proteins and lactic acid
bacteria**

Immunomodulation by a Malleable Matrix Composed of Fermented Whey Proteins and Lactic Acid Bacteria

Josée Beaulieu,^{1,2} Roger Dubuc,¹ Nicolas Beaudet,^{1,3} Claude Dupont,¹ and Pierre Lemieux²

¹Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier; ²Technologie Biolactis, Laval; and ³Département de Physiologie et Biophysique, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

ABSTRACT Functional foods and nutraceuticals have gained in popularity over the last 10 years. Among natural health products, whey proteins and fermented milk products are paramount. A malleable protein matrix (MPM), composed of whey fermented by a lactic acid bacterium, capsular exopolysaccharides, vitamins, minerals, and peptides generated during the fermentation process, has the potential to be unique by combining multiple health-promoting components. Forced feeding experiments on healthy animals were performed to evaluate the immunomodulatory effect of MPM. Glutathione production, antibody response, and the modulation of leukocyte populations were monitored. The stimulation of the immune system by MPM consumption was evident as seen by the increased polymorphonuclear cell counts and intracellular glutathione levels. The absence of MPM-specific antibody production indicated a lack of undesirable immune recognition of MPM. The MPM, with its immunomodulatory properties, has the potential to be a food substitute or a functional food for maintenance of general immune health.

KEY WORDS: • antioxidant • innate immunity • nutraceuticals • probiotics

INTRODUCTION

THERE IS GROWING EVIDENCE that modern life-style and in particular malnutrition have a direct negative impact on immune homeostasis and on the decline of white blood cell counts.¹ Nutraceutical products and functional foods are known to counteract this impact and maintain immune balance.² Milk- and whey-derived products, which are known for their positive effects including modulation of the immune system,³ are prime examples. It has been demonstrated that these products exhibit an antioxidant potential by increasing glutathione contents,^{4,5} act as anti-inflammatory⁶ and anti-allergic^{6,7} agents, and exhibit immunomodulatory potential.^{3,8–13} Specifically, whey proteins, principally lactoferrin, exert their immunomodulatory potential by stimulating the phagocytosis process by human neutrophils and the production of interleukin (IL)-8.⁹ Lactoferrin also possesses anti-inflammatory effects in animal models by stimulation of regulatory IL-10 production.^{7–14} The whey proteins β -lactoglobulin, bovine serum albumin, and α -lactalbumin stimulate immune cell production.^{11–15} The presence of peptides in whey-derived products depends of the formulation process. Some studies indicate that whey pep-

tides exert also immunomodulatory potential; however, this research is relatively recent, and many other effects could be attributed to the presence of whey peptides.³ Studies indicate that whey peptides stimulate lymphocyte production and activity and increase secretory immunoglobulin (Ig) A production in Peyer's patches.^{13–16}

Lactic acid bacteria (LAB), commonly known as probiotics, are also functional foods that possess many immunomodulatory effects. The genus *Lactobacillus*, the most studied of these probiotics, is commonly used in the milk fermentation process.¹⁷ It has also been demonstrated that the effects of probiotics in synergy with food ingredients could be more intense than the probiotics alone.¹⁸ The effects of LAB are strain-dependent, but many *Lactobacillus* strains act on Peyer's patches to stimulate the production of secretory IgA, help phagocytosis, exhibit anti-inflammatory action by regulation of cytokine production and anti-allergic potential by reduction of IgE production.^{19–22} LAB increase the production of a large variety of cytokines depending on the strain used; some increase the Th1 profile, while others increase the Th2 profile.²³

A novel whey-derived ingredient, the malleable protein matrix (MPM), is obtained from whey fermented by *Lactobacillus kefirifaciens* strain R2C2 isolated from kefir grains.²⁴ The final product, MPM, is composed principally of fermented whey proteins and LAB. Also present in MPM are exopolysaccharides produced by strain R2C2, niacin, riboflavin, a high proportion of calcium, and peptides generated during the fermentation process. The MPM composi-

Manuscript received 16 June 2006. Revision accepted 10 October 2006.

Address reprint requests to: Pierre Lemieux, Ph.D., Technologie Biolactis, 500 Boulevard Cartier, Suite 218, Laval, Québec, Canada, H7V 5B7, E-mail: plemieux@biolactis.com

tion is completely reported in Table 1. As mentioned, all the major components of MPM are known for their immunomodulatory potential. Moreover, the vitamins niacin and riboflavin as well as calcium have been proven to have immunomodulatory effects.²⁵⁻²⁷

The objective of this present study is to evaluate the immunomodulatory potential of the MPM. The composition of MPM points to an eventual immunomodulatory effect; however, it is conceivable that it will possess an elevated immunomodulatory potential. This potential has been evaluated using a healthy rat model.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Humid and lyophilized MPM fractions were obtained from Technologie Biolactis Inc. (LaBaie, QC, Canada). MPM was given orally in either its original humid form or reconstituted. Lyophilized MPM required reconstitution in water (20 g of lyophilized MPM:80 mL of water) corresponding to the original MPM water content. Final reconstitution was completed by mixing for 2 minutes with a blender at maximum speed. The final reconstituted product was stable at 4°C for at least 1 month in sterile environment. The whey isolate product, HMS90, was obtained from Im-

munocal (Montreal, QC, Canada) and reconstituted in accordance with the manufacturer's instructions. Danone light natural yogurt was used undiluted in some experiments.

Animals

Wistar or Lewis female rats were obtained from Charles River Laboratories (St-Constant, QC, Canada) and used at 7 weeks of age for studies in healthy rats. The animals were housed in filter-top isolator cages in a room kept at 20–23°C with humidity maintained between 35% and 45% and a 12-hour light–dark cycle with free access to a standard laboratory pelleted diet (Rodent Lab Diet 5001, Ren's Feed & Supplies Ltd., Oakville, ON, Canada). The experimental protocols used were approved by the Animal Care Committee of the Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier (Comité Institutionnel des Soins aux Animaux et de Leur Utilisation) (Laval, QC, Canada) and were performed in accordance with the recommendations of the Canadian Council on Animal Care as specified in the National Institutes of Health's *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*.

Total white blood cell counts

Four groups of Lewis rats ($n = 5$) were given *per os* 1 mL of saline, humid MPM, reconstituted HMS90, or yogurt twice a day for 4 days. On day 4, 0.5 mL of blood was collected by jugular puncture, and total white blood cells were counted by confocal microscopy (microscope from Leitz, Wetzlar, Germany) following a blood treatment with Unopette® brand capillary pipettes (Becton Dickinson, San Diego, CA) in accordance with the manufacturer's instructions.

Distinctive white blood cell counts

Two groups of Wistar rats ($n = 6$) were given *per os* 1 mL of water or humid MPM twice a day for 4 days. Blood was collected (0.5 mL) by jugular puncture at day 4. The lymphocyte, monocyte, and polymorphonuclear (PMN) cells were identified with biotin anti-rat CD45-specific marker and streptavidin-PE-Cy5 to complete the reaction (BD Biosciences Pharmingen, San Diego). The red blood cells were lysed with Optilyse® C (Beckman Coulter, Fullerton, CA) in accordance with the manufacturer's instructions. The cell counts were obtained by passage of 20 μ L of preparation in an Epics® XL™ flow cytometer (Beckman Coulter). The lymphocytes, monocytes, and PMN cells were separated in accordance with size and surface expression level of CD45.

Total and MPM-specific antibody production

Four groups of Wistar rats ($n = 6$) were given *per os* 1 mL of water, humid MPM, lyophilized MPM, or reconstituted HMS90 twice a day for 18 days. After 18 days, 1 mL of blood was collected by jugular puncture, and the antibody levels were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay.

TABLE 1. COMPOSITION OF MPM

	Composition (g/100 g)
Humidity	80.0
Protein	8.3
Fat	1.2
Ash (minerals)	5.9
Carbohydrates	4.7
Lactose	2.7
Galactose	0.2
Minerals (mg/100 g)	
Potassium	142.9
Sodium	175.2
Calcium	1,507.4
Phosphorus	730.3
Selenium	<0.1
Magnesium	5.4
Oligo-elements (mg/100 g)	
Copper	0.07
Iron	0.24
Manganese	0.05
Zinc	0.13
Vitamins (mg or μ g/100 g)	
Riboflavin (B ₂)	0.32 mg
Niacin (B ₃)	1.00 mg
Pyridoxine (B ₆)	0.04 mg
Cobalamine (B ₁₂)	Not detected
Ascorbic acid (C)	Not detected
Folic acid	5 μ g
Bacterial count (CFU/100 g)	
LAB	6×10^{11}

CFU, colony-forming units.

For the total antibody production, 1:100–1:15,000 serum dilutions in carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) (Sigma-Aldrich Canada, Oakville) were incubated in a 96-well microplate for 1 hour at 37°C and after that overnight at 4°C. The plate was washed twice with Tris-buffered saline-Tween 20 (0.1%) buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl, and 0.05% Tween 20]. After incubation with blocking reagent solution (Roche Diagnostics, Montreal), anti-rat IgG peroxidase-labeled antibody (Sigma-Aldrich Canada) was added, and the plate was incubated for 2 hours at 37°C followed by addition of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) substrate (ABTS) (Sigma-Aldrich Canada) diluted in phosphate-citrate buffer (Sigma-Aldrich Canada). The total antibody production was evaluated by optical density at 405 nm after 15, 30, and 45 minutes of incubation at 37°C.

For the determination of MPM-specific antibody production, the MPM diluted 1:100 in carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) was incubated for 1 hour at 37°C and after that overnight at 4°C. The plate was washed twice with Tris-buffered saline-Tween 20 (0.1%) buffer. After the incubation with blocking reagent solution (Roche Diagnostics), 1:2–1:50 serum dilutions in phosphate-buffered saline were added to the plate and incubated for 2 hours at 37°C. Anti-rat IgG peroxidase-labeled antibody (Sigma-Aldrich Canada) was then added and incubated for 2 hours at 37°C, followed by addition of ABTS substrate diluted in phosphate-citrate buffer. The MPM-specific antibody production was evaluated by optical density at 405 nm after 15, 30, and 45 minutes of incubation at 37°C.

Determination of intracellular reduced glutathione (GSH) contents

Four groups of Wistar rats ($n = 6$) received *per os* 1 mL of water, humid MPM, lyophilized MPM, or reconstituted HMS90 twice a day for 18 days. After 18 days, 1 mL of blood was collected by jugular puncture. The method used for the determination of GSH contents is modified from those reported by Anderson²⁸ and Tietze.²⁹ The red blood cells were mixed vigorously with 15% sulfosalicylic acid dihydrate (Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada). After centrifugation, the supernatant was diluted in 5% sulfosalicylic acid dihydrate. The GSH reaction was done with distilled water, NADPH tetrasodium salt (Roche, Laval), 5',5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (Sigma-Aldrich Canada), and glutathione reductase (Roche, Laval) in a ratio of 16.5:70:10:1, respectively. Samples of 50 μ L were analyzed *in continu* at an optical density of 412 nm for 20 minutes with a spectrophotometer (Varian Cary 300, Varian, St-Laurent, QC, Canada). The results were reported on a GSH standard curve (Sigma-Aldrich Canada).

Statistical analysis

The experiments in healthy rats were performed with a minimum number of six rats per group. The statistical analy-

sis of data was done with the *t* test using Sigma Plot analysis software (Systat Software, San Jose, CA).

RESULTS

The MPM is a whey-fermented product that should possess, by its composition (Table 1), an interesting immunomodulatory potential. The objective of this study was to demonstrate this potential by the use of healthy rats. Figure 1 shows that following a 4-day period of product consumption, the MPM increases the level of white blood cells 1.8-fold in normal healthy rats compared to the control group. Moreover, the effect of MPM suggests that it possesses a better immunomodulatory effect than other commercial whey and milk protein-based products such as HMS90 or regular yogurt (Fig. 1). Indeed, whey isolates HMS90 increased the total white blood cell count only 1.2-fold compared to the control group, while yogurt showed a reduction in total white blood cell count.

The type of immune cells being increased after MPM consumption was also evaluated. Figure 2 demonstrates that the increase in white blood cell production previously observed is associated with a specific increase in PMN circulating cells. The MPM consumption stimulates the PMN production by 1.8-fold compared to the control group at day 4. These results correlate with the increase in total white blood cell counts previously observed and demonstrate that it is specifically associated with PMN counts since MPM consumption increases total white blood cells (Fig. 1) and the PMN counts (Fig. 2) identically after 4 days. No stimulation in lymphocyte cells or monocyte cells was observed upon MPM consumption.

MPM consumption does not influence the antibody production. The total antibody level remained unchanged after consumption of MPM, and no difference was observed between groups (data not shown). The MPM-specific antibody production was evaluated to confirm the absence of allergens or immune recognition of MPM following its consumption. No MPM-specific antibody production was observed in any group (data not shown). This result confirms that the lack of previous consumption of MPM by the rats does not lead to an undesirable reaction toward MPM.

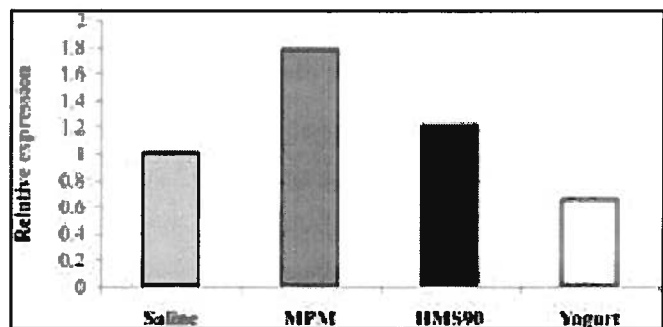


FIG. 1. Circulating total leukocyte counts in healthy rats, following a 4-day peroral administration.

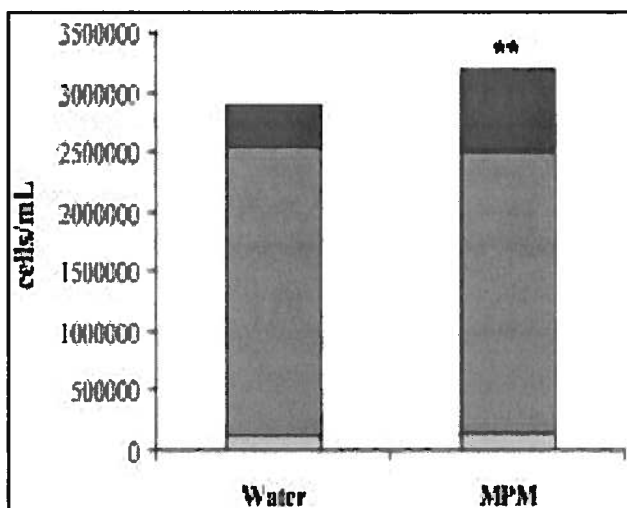


FIG. 2. Circulating cell counts in healthy rats ($n = 6$) after a 4-day peroral administration: monocyte counts (■), lymphocyte counts (■), and PMN counts (■). ** $P < .01$.

The MPM exhibits an antioxidant potential as shown by an increase of 1.25-fold in intracellular GSH content (Fig. 3). Moreover, the GSH content following MPM consumption showed a similar result to that observed with consumption of the HMS90 control, which is recognized as a strong GSH enhancer product.³⁰

DISCUSSION

Leukocytes, also referred as white blood cells, are implicated in immune defense. The number and activity of these cells are variable between individuals and are associated with a number of factors, including age, levels of preliminary exposure to antigens, individual health, etc.³¹ Nutrition is also an important factor in the development of an appropriate defense by the immune system. It is well known that many foods exert stimulatory effects on immunity, including, notably, yogurt containing LAB.³²

The MPM contains many ingredients; including whey proteins and peptides, LAB and their exopolysaccharides, group B vitamins, and calcium (Table 1). All these ingredients have demonstrated known effects on the immune system.^{3,10,11,27,33,34} Thus, it was expected that the MPM would also exert an immunomodulatory potential, possibly greater than the sum of its parts, due to a synergistic effect between the constituents that would contribute to the beneficial effect observed with MPM consumption.

Stimulation of the production of total white blood cells was the first evidence of an immunomodulation by the MPM. The total white blood cell counts in healthy rats fed with MPM was compared to those in rats fed with yogurt (Danone) or whey isolate protein HMS90 (Immunocal). Lewis rats showed an increase of 1.8-fold in the total white blood cell count, confirming the immunostimulatory effect of the MPM on total leukocyte production. It was then im-

portant to determine which leukocyte population (lymphocytes, monocytes, or PMN cells) was specifically stimulated. To investigate the modulation of leukocyte subpopulations, Wistar rats were used. The combination of anti-rat CD45 antibody expression and size separation using flow cytometry allowed separation of the three populations. Only the PMN population was stimulated by the MPM consumption (Fig. 2). These immune cells are the most important cells implicated in innate immune defense since they are implicated principally in pathogen recognition and destruction by the phagocytosis process.³¹ These cells also possess an important role in adaptive immune defense due to their function as antigen presenting cells to lymphocytes. The MPM permits a stimulation of innate immunity and could help in the role of antigen-presenting cells by the PMN cells. Consequently, the organism will have a better nonspecific and perhaps specific protection against pathogen invasion.³¹ The increase in PMN circulating cells suggests that the MPM would be a good supplement to stimulate innate immunity in healthy people and could be beneficial for immunosuppressed individuals.

It was important to demonstrate that this PMN augmentation was not associated with a negative immune reaction against the MPM. The first indication is that the augmentation of leukocyte count is not associated with animals that have not previously consumed whey proteins. The composition of Rodent Lab Diet 5001 is defined with a significant proportion of whey proteins (2–3% of dried whey). Second, the absence of MPM-specific antibody production confirmed the absence of undesirable reaction toward MPM. Although the total antibody level is not enhanced by MPM consumption, the potential of MPM to act as a natural oral adjuvant in specific antibody production following vaccination remains and will be the basis of future experiments. The antioxidant potential, demonstrated by GSH content, is another indication

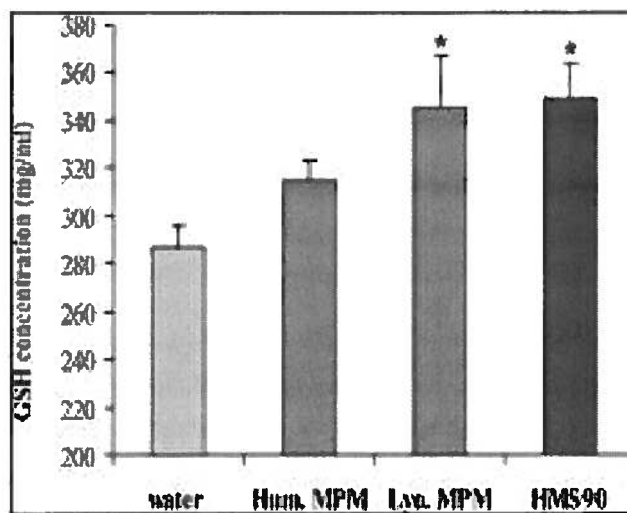


FIG. 3. Intracellular GSH content in white blood cells from healthy rats ($n = 6$), following a 18-day peroral administration. Hum., humimified; Lyo., lyophilized. * $P < .05$.

of the immunomodulatory effect of MPM (Fig. 3). It is known that GSH is a natural intracellular antioxidant very efficient in neutralizing free radicals but also has an important role in immunity. The antioxidant functions permit health maintenance and prevention against diseases.³⁵ An elevated level of GSH permits the organism to produce more leukocytes and, consequently, permits activation of immune defense.⁴ GSH is a well-known natural antioxidant, neutralizing free radicals, and has multiple health benefits especially in cancer prevention and in AIDS by means of its stimulatory effect on basic functions of immune cells.⁴ The same benefits would be expected upon MPM consumption. The whey protein isolate HMS90 stimulated the production of GSH but in the absence of leukocyte stimulation. Reports indicate that whey protein isolates generally exert their immunomodulatory effect on splenocyte proliferation^{36,37} or humoral stimulation following antigen immunization.^{12,38,39} Conversely, the MPM showed an immunostimulatory potential on innate immunity by stimulation of circulating cells without previous antigen stimulation. The effect of the MPM is different than that associated with whey isolate products, indicating that MPM's complex composition exhibits a synergic effect. This immunostimulatory capacity indicates that the MPM would also be a good candidate for studies in the prevention of diseases by its general effect on immunity.

In conclusion, the MPM represents a good nutraceutical that would permit stimulation of the innate immune defense in the case of healthy individuals. This immunostimulatory potential of the MPM could increase general immunity that is required to increase resistance against viruses and pathogenic bacteria, as well as tumors. Although these results are promising, it is important to demonstrate the absence of negative effects associated with the increase in PMN cells as in the case of inflammatory diseases; this will be the focus of future studies with the MPM.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank M. Louis-Philippe Précourt for help in animal studies and result interpretation. François Shareck, Alain Lamarre, and Denis Girard are thanked for the intellectual help in design of animal experiments as well as results interpretation. This study was funded by the National Science and Engineering Research Council of Canada Strategic Grant STP 246405-1. J.B. was a Ph.D. scholar of the Fond de Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

1. Singh M: Role of micronutrients for physical growth and mental development. *Indian J Pediatr* 2004;71:59-62.
2. Calder PC, Kew S: The immune system: a target for functional foods? *Br J Nutr* 2002;88(Suppl):S165-S176.
3. Beaulieu J, Dupont C, Lemieux P: Whey proteins and peptides: beneficial effects on immune health. *Therapy* 2006;3:1-10.
4. Bounous G, Gold P: The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. *Clin Invest Med* 1991;14:296-309.
5. Kent KD, Harper WJ, Bomser JA: Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cells. *Toxicol In Vitro* 2003;17:27-33.
6. Kano H, Mogami O, Uchida M: Oral administration of milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1037R-1 to DBA/1 mice inhibits secretion of proinflammatory cytokines. *Cytotechnology* 2002;40:67-73.
7. Ward PP, Uribe-Luna S, Conneely OM: Lactoferrin and host defense. *Biochem Cell Biol* 2002;80:95-102.
8. Cross ML, Gill HS: Modulation of immune function by a modified bovine whey protein concentrate. *Immunol Cell Biol* 1999;77:345-350.
9. Miyauchi H, Hashimoto S, Nakajima M, Shinoda I, Fukuwatari Y, Hayasawa H: Bovine lactoferrin stimulates the phagocytic activity of human neutrophils: identification of its active domain. *Cell Immunol* 1998;187:34-37.
10. Migliore-Samour D, Roch-Arveiller M, Tissot M, Jaziri M, Keddad K, Giroud JP, Jolles P: Effects of tripeptides derived from milk proteins on polymorphonuclear oxidative and phosphoinositide metabolisms. *Biochem Pharmacol* 1992;44:673-680.
11. Brix S, Bovetto L, Fritsche R, Barkholt V, Frokiaer H: Immunostimulatory potential of beta-lactoglobulin preparations: effects caused by endotoxin contamination. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:1216-1222.
12. Wong CW, Watson DL: Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. *J Dairy Res* 1995;62:359-368.
13. Gill HS, Doull F, Rutherford KJ, Cross ML: Immunoregulatory peptides in bovine milk. *Br J Nutr* 2000;84(Suppl 1):S111-S117.
14. Kimber I, Cumberbatch M, Dearman RJ, Headon DR, Bhushan M, Griffiths CE: Lactoferrin: influences on Langerhans cells, epidermal cytokines, and cutaneous inflammation. *Biochem Cell Biol* 2002;80:103-107.
15. Clare DA, Catignani GL, Swaisgood HE: Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides. *Curr Pharm Des* 2003;9:1239-1255.
16. Matar C, Valdez JC, Medina M, Rachid M, Perdigon G: Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. *J Dairy Res* 2001;68:601-609.
17. Ouwehand AC: Probiotics: time to move beyond Metchnikoff? *Drug Discov Today* 2003;8:1063.
18. Kopp-Hoolohan L: Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Diet Assoc* 2001;101:229-238.
19. Clancy R: Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;38:9-12.
20. Erickson KL, Hubbard NE: Probiotic immunomodulation in health and disease. *J Nutr* 2000;130(Suppl):403S-409S.
21. Kitazawa H, Watanabe H, Shimosato T, Kawai Y, Itoh T, Saito T: Immunostimulatory oligonucleotide, CpG-like motif exists in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NIAI B6. *Int J Food Microbiol* 2003;85:11-21.
22. Chapat L, Chemin K, Dubois B, Bourdet-Sicard R, Kaiserlian D: *Lactobacillus casei* reduces CD8+ T cell-mediated skin inflammation. *Eur J Immunol* 2004;34:2520-2528.
23. Cross ML, Mortensen RR, Kudsk J, Gill HS: Dietary intake of *Lactobacillus rhamnosus* HNOO1 enhances production of both Th1 and Th2 cytokines in antigen-primed mice. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2002;191:49-53.
24. Simard E, Pilote D, Dupont C, Lajoie N, Quet M, Lemieux P, Goyette P, inventors: Malleable protein matrix and uses thereof. U.S. Patent 20060057131. March 16, 2006.

25. Reddy S, Young M, Ginn S: Immunoexpression of interleukin-1beta in pancreatic islets of NOD mice during cyclophosphamide-accelerated diabetes: co-localization in macrophages and endocrine cells and its attenuation with oral nicotinamide. *Histochem J* 2001;33:317-327.
26. Grimble RF: Effect of antioxidative vitamins on immune function with clinical applications. *Int J Vitam Nutr Res* 1997;67:312-320.
27. Meydani SN, Ha WK: Immunologic effects of yogurt. *Am J Clin Nutr* 2000;71:861-872.
28. Anderson ME: Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. In: *Methods in Enzymology, Vol. 113: Glutamate, Glutamine, Glutathione, and Related Compounds* (Meister A, ed.), Academic Press, Orlando, FL, 1985, pp. 548-555.
29. Tietze F: Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969;27:502-522.
30. Lands LC, Grey VL, Smountas AA: Effect of supplementation with a cysteine donor on muscular performance. *J Appl Physiol* 1999;87:1381-1385.
31. Janeway CA, Travers P: *Immunobiologie*, De Boeck et Larcier ed, Paris, 1996.
32. Fandrich F, Zhou X, Schlemminger M, Lin X, Dresske B: Future strategies for tolerance induction: a comparative study between hematopoietic stem cells and macrophages. *Hum Immunol* 2002; 63:805-812.
33. Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Saag KG: Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum* 2004;50:72-77.
34. Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P: An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 2002;12:163-171.
35. Bray TM, Taylor CG: Enhancement of tissue glutathione for antioxidant and immune functions in malnutrition. *Biochem Pharmacol* 1994;47:2113-2123.
36. Wong KF, Middleton N, Montgomery M, Dey M, Carr RI: Immunostimulation of murine spleen cells by materials associated with bovine milk protein fractions. *J Dairy Sci* 1998;81:1825-1832.
37. Bounous G, Kongshavn PA: Differential effect of dietary protein type on the B-cell and T-cell immune responses in mice. *J Nutr* 1985;115:1403-1408.
38. Afuwape AO, Turner MW, Strobel S: Oral administration of bovine whey proteins to mice elicits opposing immunoregulatory responses and is adjuvant dependent. *Clin Exp Immunol* 2004; 136:40-48.
39. Low PPL, Rutherford KJ, Gill HS, Cross ML: Effect of dietary whey protein concentrate on primary and secondary antibody responses in immunized BALB/c mice. *Int Immunopharmacol* 2003;3:393-401.

Annexe 4. Anti-inflammatory potential of a malleable matrix composed of fermented whey proteins and lactic acid bacteria in an atopic dermatitis model

Research

Open Access

Anti-inflammatory potential of a malleable matrix composed of fermented whey proteins and lactic acid bacteria in an atopic dermatitis model

Josée Beaulieu^{1,2}, Claude Dupont¹ and Pierre Lemieux*²

Address: ¹Institut national de la recherche scientifique, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7 and ²Technologie Biolactis, 500 boul. Cartier suite 218, Laval, Québec, Canada, H7V 5B7

Email: Josée Beaulieu - josee.beaulieu@iaf.inrs.ca; Claude Dupont - claude.dupont@iaf.inrs.ca; Pierre Lemieux* - plemieux@biolactis.com

* Corresponding author

Published: 21 March 2007

Received: 9 June 2006

Accepted: 21 March 2007

Journal of Inflammation 2007, 4:6 doi:10.1186/1476-9255-4-6

This article is available from: <http://www.journal-inflammation.com/content/4/1/6>

© 2007 Beaulieu et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Over the last 10 years, whey proteins have received considerable attention in the area of functional foods and nutraceuticals. In this paper, a novel fermented whey protein-based product described as a gel-like Malleable Protein Matrix (**MPM**) has been tested for its anti-inflammatory activity. Preliminary *in vitro* results have already indicated that MPM could exert such an anti-inflammatory activity.

Methods: The systemic anti-inflammatory activity of the MPM was explored using the oxazolone-induced atopic contact dermatitis mouse model (ACD). Parameters including ear thickness, side effects as well as neutrophil extravasation were monitored.

Results: In the ACD model, the MPM exhibited an anti-inflammatory effect comparable to that of hydrocortisone (positive control). Mice fed with MPM showed strong reduction of the ear inflammation while no side effects, as compared to hydrocortisone, were observed. The MPM seemed to reduce neutrophil extravasation in tissue as evidenced by blood polymorphonuclear cells and ear myeloperoxidase content.

Conclusion: The anti-inflammatory activity demonstrated in the ACD model suggests that the mechanism of action of the MPM is different than that of hydrocortisone and could become a relevant product for people suffering from dermatological manifestations associated with immune dysfunctions such as allergies, eczema, dermatitis, and autoimmune diseases.

Background

Modern life-styles which leads to obesity, stress and inactivity, is a major cause of immunological diseases, particularly those associated with chronic inflammation which are on the upswing during the last decade [1-3]. Many evidences exist that functional foods have protective effects on immune deficiency [4-6] including whey proteins, which can modulate some immune functions [5]. Other

studies revealed that whey proteins possess a myriad of activities including antioxidant activity attributed to increasing glutathione content [7,8], anti-allergic, [9] anti-inflammatory [9-11] and immunomodulatory activities [12-19]. Whey proteins such as β -lactoglobulin (β -LG), bovine serum albumin (BSA) and α -lactalbumin (α -LA) have been shown to stimulate splenocyte proliferation, increase interleukin-1 production by macrophages and

increase GSH production [18,19]. Whey peptides have recently been shown to possess immunomodulatory activities such as a stimulation of lymphocytes, an increasing in phagocytosis process as well as in secretion of immunoglobulin A (IgA) by Peyer's patches [5,13,17,20].

Lactoferrin (LF), a minor whey protein, has been extensively studied. LF assists the phagocytosis process in neutrophils, increases production of interleukin-8 (IL-8) [13] and stimulates immune cell production [15,19,21]. Moreover, LF has also demonstrated anti-inflammatory effects in animal models by an inhibition of pro-Th1 cytokines and an increasing in regulatory cytokine IL-10 production [9,11]. More specifically, LF exerts its anti-inflammatory effect during mouse atopic contact dermatitis (ACD) by reducing ear thickness and infiltration of inflammatory cells following a direct topical contact [11].

In addition, some Lactic Acid Bacteria (LAB) have shown immunomodulatory and anti-inflammatory activities. The genus *Lactobacillus* commonly used in many fermented dairy products [22] is the most studied of these probiotics [23]. The effects of LAB are very strain-dependent but many *lactobacilli* act on Peyer's patches to stimulate IgA production, phagocytosis process and possess anti-inflammatory and anti-allergic activities by reducing the production of cytokines and immunoglobulin E (IgE) [24-27]. Cytokine production is also strain-dependent as some *lactobacilli* are able to increase Th1 profile while others increase Th2 profile [28]. These results suggest that *lactobacilli* could act both as immunostimulating and anti-inflammatory agents. Some studies also indicate that the effects of probiotics acting in synergy with food ingredients can be more intense than the probiotics alone [29]. Moreover, vitamins present in the MPM (niacin and riboflavin) as well as calcium also possess immunomodulatory effects [30-32].

Considering the positive effects on the immune system of both whey proteins and probiotic *lactobacilli*, a novel fermented whey protein-based ingredient, called Malleable Protein Matrix (MPM) [33], was tested for its immunomodulatory activities [34]. It was previously demonstrated that MPM stimulates production of blood polymorphonuclear cells, cytokine IL-18 as well as glutathione by white blood cells in healthy rat suggesting a stimulation of innate immunity [33,34]. On the other hand, MPM can also reduce the production of important pro-inflammatory cytokines such as TNF α [33]. Moreover, it was shown *in vitro* that MPM reduces pro-inflammatory cytokines and inhibits the cytokines production following LPS stimulation on CaCo2 cells [33]. These results suggested that MPM might also exhibit anti-inflammatory properties when placed in the context of inflammation.

The objective of this present study was to evaluate the systemic anti-inflammatory potential of MPM and to determine how its complex composition may lead to synergistic effects. For this purpose, the oxazolone-induced atopic contact dermatitis mouse model (ACD) was used. This ACD mouse model requires two distinct phases [35]. First, the sensitization phase is initiated by topical application of oxazolone, which permits the activation of T cells through Langerhans cells acting as an antigen presenting cells. The elicitation phase is next achieved by a subsequent topical application of oxazolone, which initiate the inflammatory process by recruiting activated T effector cells which in turn attract inflammatory cells [36-38]. The inflammatory cells recruited in this ACD model are principally macrophages, which attract neutrophils in the early inflammatory phase and monocytes as well as dendritic cells in the early and late inflammatory phases. CD4+ T cells act as regulatory cells and not as effector cells in the ACD model, in which they control the intensity of inflammatory reaction [39,40]. A similar dermatitis model has recently been used to evaluate the anti-inflammatory activity of LF [11] and a milk-product fermented by *Lactobacillus casei* [27].

Methods

Reagents

The Malleable Protein Matrix (MPM) was obtained from Technologie Biolactis inc. (*LaBaie, Qc, Canada*). Briefly, the MPM is obtained by a protein specific recuperation procedure following the fermentation of sweet whey by a proprietary *Lactobacillus kefiranofaciens* strain (R2C2) isolated from kefir grains and adapted to grow in whey [33]. The composition of MPM is shown in Table 1. On a humid basis (w/w), the MPM contains 80% water, 8% protein, 6% minerals (2% calcium), 5% carbohydrate (2.7% lactose) and less than 1% of fat. Lyophilized MPM required reconstitution in water: 20 g of lyophilized MPM was blended with 80 mL of water for 2 minutes at maximum speed (20% w/v). The final reconstituted product is stable at 4°C for at least 1 month. Water-soluble hydrocortisone (HC) was obtained from Sigma-Aldrich Canada (*Oakville, On, Canada*) and was diluted in deionized double-distilled water to a final concentration of 10 mg/mL. For the mouse ACD model, the 4-ethoxy-methylene-2-phenyloxazol-5-one (oxazolone) (*Sigma-Aldrich Canada*) was required at a concentration of 5% (w/v) in acetone to cause inflammation.

Animals

CD-1 female mice were obtained from Charles River Laboratories (*St-Constant, Qc, Canada*) and were used at 20 days of age for studies in the mouse ACD model. The animals were housed in filter top isolator cages in a room kept at 20–23°C with humidity maintained between 35–45% with a 12-hour light-dark cycle and free access to a

Table 1: Composition of MPM

Composition (g/100 g)	
Protein	8.1
Lipids	0.9
Ash (minerals)	5.1
Carbohydrates	4.6
Lactose	2.7
Galactose	0.2
Minerals (mg/100 g)	
Potassium	142.9
Sodium	175.2
Calcium	1600
Phosphorus	730.3
Selenium	< 0.1
Magnesium	5.4
Oligo-elements (mg/100 g)	
Copper	0.07
iron	0.24
Manganese	0.05
Zinc	0.13
Vitamins (mg or µg/100 g)	
Riboflavine (B2)	0.32 mg
Niacin (B3)	1.00 mg
Pyridoxine (B6)	0.04 mg
Cobalamine (B12)	Not detected
Ascorbic acid (C)	Not detected
Folic acid	5 µg
Bacterial count (CFU/100 g)	
LAB	6 × 10 ¹¹

standard laboratory pelleted Rodent Lab Diet 5001 (*Ren's Feed & Supplies Limited, Oakville, On*). The experimental protocols used were approved by the Animal Care Committee of the INRS- Institut Armand-Frappier (Comité Institutionnel des Soins aux Animaux et de leur Utilisation (CISAU)) and were performed in accordance with the recommendations of the Canadian Council on Animal Care as specified in the Guide to the Care and Use of Experimental Animals (CISAU # 0306-01 and # 0410-01).

Mouse atopic contact dermatitis (ACD)

After a week adaptation in the animal facility, the mice were separated in groups of 10 animals. The grouping was randomized according to the weight of the rodents. The murine model of ACD was based on those firstly described by Garrigue *et al.* [41] and modified as follows: abdomen hair of CD-1 mice was removed and the sensitization phase was done by the application of 100 µL of

oxazolone 5% (w/v) in acetone on the hairless abdomen. After four days, the elicitation phase (first challenge) was initiated by the application of 50 µL of oxazolone 5% (w/v) in acetone on the right ear (25 µL each side of the ear). The second challenge was done 7 days after the first challenge with the same procedure. The ear thickness of the mice was measured every day with a digital caliper (VWR, *Mont-Royal, Canada*).

Dose-response curve

The dose-response curve has been done in the prophylactic anti-inflammatory mouse ACD model. Groups of 10 CD-1 mice received each day by gavages (per os (p.o)), 100 µL of reconstituted lyophilized MPM at three doses 20% (w/v), 10% (w/v) and 5% (w/v), 100 µL of water or 100 µL of water-soluble hydrocortisone (10 mg/mL). The mouse ACD was performed as described previously and ear thickness was measured every day.

Prophylactic protocol – Mouse ACD

The prophylactic anti-inflammatory potential of MPM was evaluated by the administration of MPM seven days prior to sensitization. Groups of 10 CD-1 mice received each day by gavages (per os (p.o)), 100 μ L of reconstituted lyophilized MPM, 100 μ L of water or 100 μ L of water-soluble hydrocortisone (10 mg/mL). The mouse ACD was performed as described previously and ear thickness was measured every day. The mice's weight was measured twice a week. The spleen's weight was measured at the end of the protocol and was normalized in accordance to each mouse's weight.

Therapeutic protocol – Mouse ACD

The therapeutic anti-inflammatory potential of MPM was evaluated by the administration of MPM, soluble hydrocortisone or water as in the prophylactic protocol, but only after the first challenge. The other parameters were followed as described.

Evaluation of peripheral white blood cell counts

At the end of the prophylactic protocol of mouse ACD, the blood of each mouse was taken and white blood cell counts evaluated by flow cytometry. Briefly, the red blood cells were lysed with Optilyse C (Beckman-Coulter, Fullerton) in accordance with manufacturer's instructions. The cell counts were obtained by passage of 20 μ L of preparation in a Flow Cytometry Epics XL cytometer (Beckman Coulter, Fullerton). The lymphocytes, monocytes and polymorphonuclears (PMN) were separated in accordance with cell size and cell granulometry.

Evaluation of ears-myeloperoxidase (MPO) content

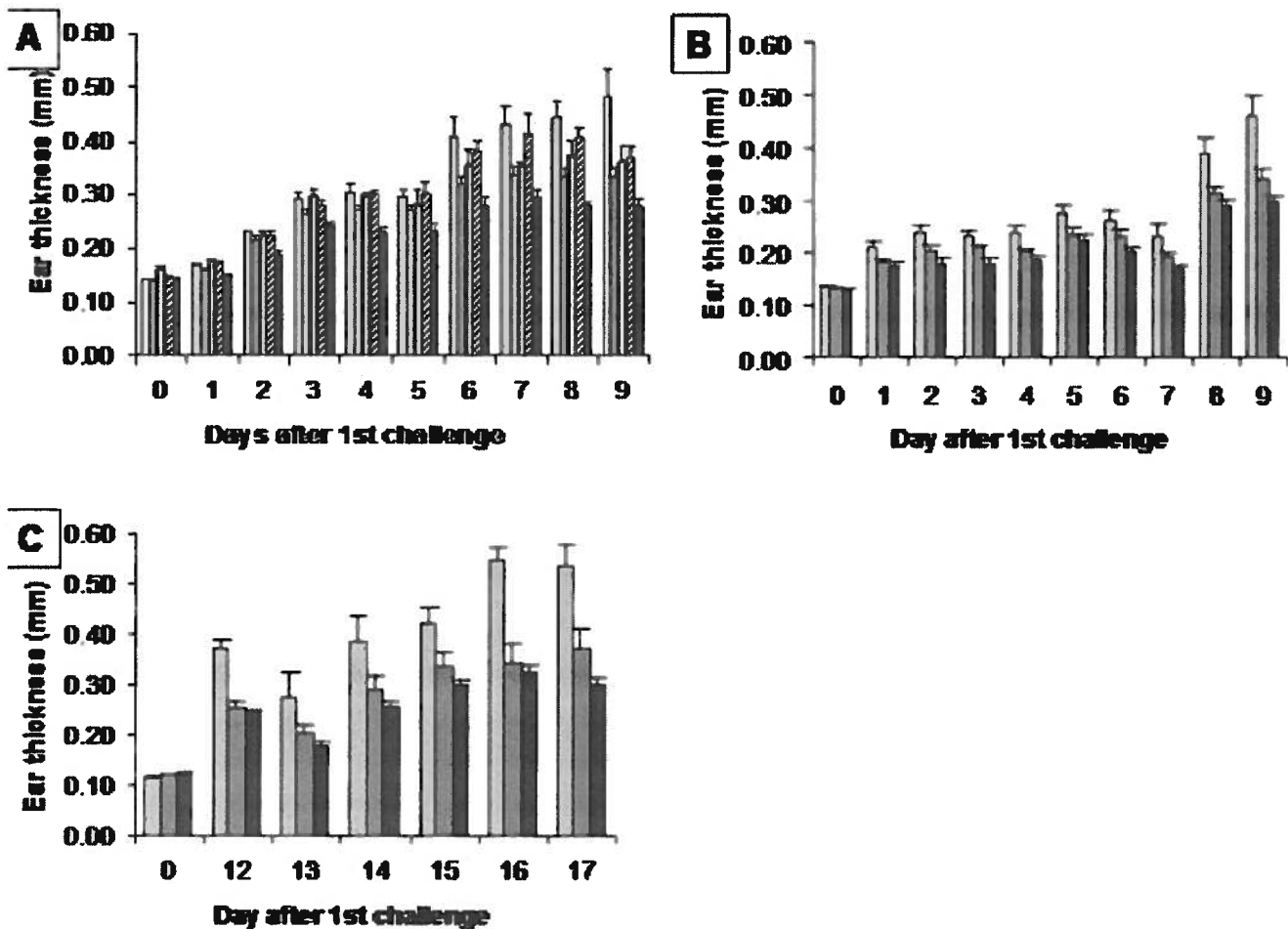
The method for the evaluation of MPO content was adapted from those developed by Bradley et al. [42] and Xia and Zweier [43]. The mice were sacrificed at the end of prophylactic protocol by CO₂ and the ears were immediately remove and frozen quickly in liquid nitrogen. The ears were chopped up and added in 50 mM phosphate potassium buffer, pH 6.0 supplemented with 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB). The ears were disrupted with three cycles of sonication (10 sec.) in water-ice bath followed by three freeze-thaw cycles in methanol-dry ice bath and another three cycles of sonication in water-ice bath. The homogenates were centrifuged at 10 000 g for 15 min at 4°C and the supernatants were conserved at -80°C until analyses. For the quantification of MPO content, 100 μ L of homogenates (or MPO standard from Sigma-Aldrich, Oakville, On) were mixed with 2.9 mL of 50 mM phosphate potassium buffer containing 0.117 mg/mL of o-dianisidine (Sigma-Aldrich, Oakville, On) and 0.0005% hydrogen peroxide. The oxydation of o-dianisidine kinetic was followed at 460 nm with a spectrophotometer Varian Cary 300 (Varian, St-Laurent, QC) during 5 min at 25°C.

Statistical analysis

The inflammatory mouse ACD experiments were performed with groups counting 10 mice/group and two independent experiments. The statistical analysis of data was performed by the biostatistical service of INRS-Institut Armand-Frappier. Statistical analysis used was a repeated measure one-way ANOVA test that permits the comparison between groups during the entire experiment independently of each day. When the ANOVA test was not possible because of interactions between groups, a Student test was run for comparison of groups at each day.

Results

MPM is a whey-fermented product, which by its composition, has a high potential as an anti-inflammatory agent. The oxazolone-induced atopic contact dermatitis (ACD) model was used for the demonstration of MPM's effect on inflammatory diseases. Figure 1 shows an important reduction of ear thickness in mice consuming MPM as compared to that of the water control group. In the dose-response curve experiment, it is demonstrated that MPM possesses a higher anti-inflammatory effect when the concentration of product was 20% (Figure 1A). Consequently, MPM has been used for all experimentations at 20%. In the prophylactic protocol (Figure 1B), the maximal reduction of ear thickness was in the order of 26% in the MPM group and 35% in the hydrocortisone group as compared to the water control group. This thickness reduction was observed immediately after the first challenge and increases markedly after the second challenge. The ANOVA test indicates that reduction of ear thickness in the MPM group was statistically different of those from water group ($p < 0.07$) for the entire experiment. However, the ANOVA between MPM and HC groups was not possible because of interaction between the two groups. However, Student test has confirmed that the difference between both groups is not statistically different for the entire experiment (with exception for day 4). This statistical analysis permits to conclude that the anti-inflammatory effect of MPM is comparable to that of hydrocortisone treatment. In the therapeutic protocol (Figure 1C), the reduction of ear thickness was statistically different only after the second challenge in the MPM group compared to the water control group and reached a maximal reduction of 37%. For the group treated with hydrocortisone the maximal reduction of ear thickness reached 40%. Using the prophylactic protocol, these anti-inflammatory observations were confirmed in another independent experiment with the same batch of MPM and also with two other different batches of MPM. The results obtained were similar and statistically significant as confirmed by the ANOVA analysis, indicating the reproducibility of anti-inflammatory effect using different batches of MPM (data not shown).

**Figure 1**

Ear thickness of mice administered p.o. with the MPM, hydrocortisone or water. A. Dose-response curve during the prophylactic model: Administrations started 7 days prior sensitization and challenges with oxazolone ($p < 0.07$ for MPM 20% and hydrocortisone groups compared with water reference group in the ANOVA statistical analysis). Legend: Light-grey bars: Water, Dark-grey bars: MPM 20%, White bars: MPM 10%, Hashed bars: MPM 5%, Black bars: Hydrocortisone. B. Prophylactic model: Administrations started 7 days prior sensitization and challenges with oxazolone ($p < 0.07$ for MPM and hydrocortisone groups compared with water reference group in the ANOVA statistical analysis) Legend: Light-grey bars: Water, Dark-grey bars: MPM, Black bars: Hydrocortisone. C. Therapeutic model: Administrations started after sensitization but during oxazolone challenges ($p < 0.05$ for MPM and hydrocortisone groups compared to water reference group in the ANOVA statistical analysis from day 8 until the end of experiment). Legend: Light-grey bars: Water, Dark-grey bars: MPM, Black bars: Hydrocortisone. ($n = 10$)

The consumption of hydrocortisone is associated with a negative effect on mice growth which is clearly demonstrated by the cessation of growth in the mice who received hydrocortisone (Figure 2). The MPM demonstrated an absence of detrimental effect on growth in comparison to water control group. Moreover, the hydrocortisone treatment induced a spleen atrophy represented by a 50% reduction in spleen weight as compared to water or MPM consumption (Figure 3). This spleen atrophy indicates an immunosuppression of immune

cells after hydrocortisone treatment. No statistical difference was observed between the water and MPM group on spleen weight suggesting no immunosuppression following MPM consumption. The cell counts confirmed this immunosuppression following hydrocortisone treatment as demonstrated by the important reduction (approximately 50%) in circulating lymphocytes in comparison to water control group (Figure 4). On the contrary, the MPM consumption showed a tendency to increase lymphocyte numbers. These results indicated that MPM consumption

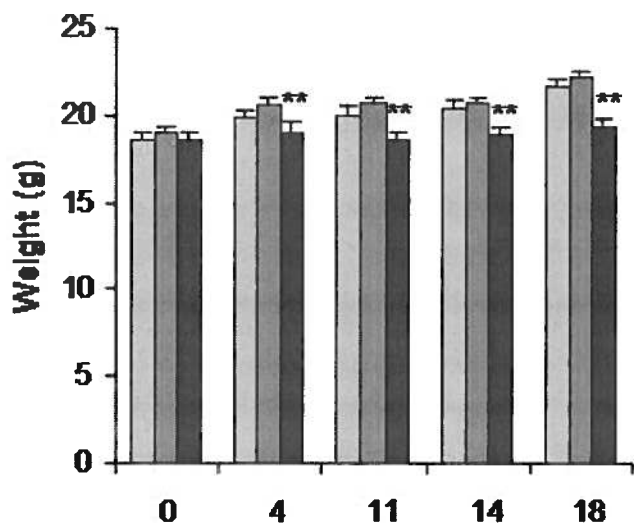


Figure 2
Mice weight during the prophylactic ACD model. Legend: Light-grey bars: Water, Dark-grey bars: MPM, Black bars: Hydrocortisone. (* p < 0.05) (n = 10)

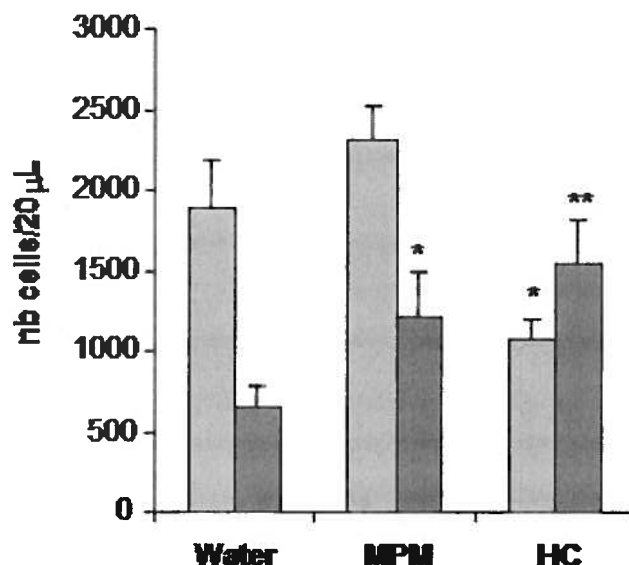


Figure 4
Circulating cell counts 17 days after the first oxazolone challenge in the prophylactic ACD model. Legend: Light-grey bars: Lymphocyte counts, Dark-grey bars: PMN counts (* p < 0.05; ** p < 0.01) (n = 10)

do not induce side effects generally associated with hydrocortisone treatment.

The polymorphonuclear (PMN) cell counts were higher in MPM and hydrocortisone fed groups compared to the

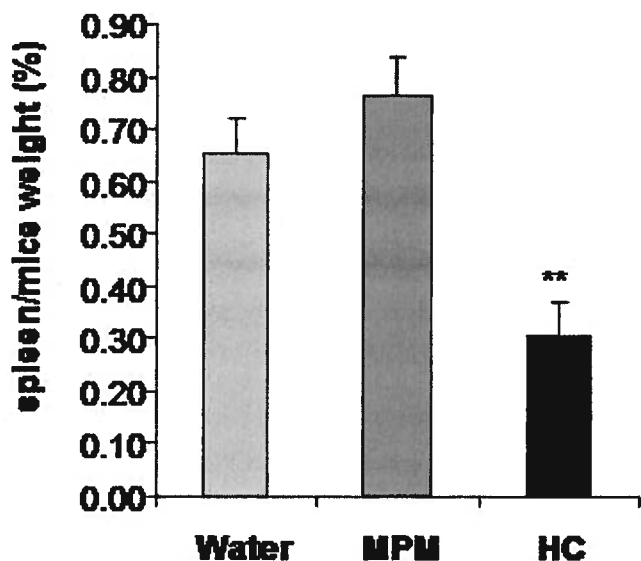


Figure 3
Mice spleen weight at the sacrifice in the prophylactic ACD model. Legend: Light-grey bars: Water, Dark-grey bars: MPM, Black bars: Hydrocortisone. (** p < 0.01) (n = 10)

water control group (Figure 4). The blood PMN counts were 1.86 and 2.35 fold higher in MPM and hydrocortisone respectively indicating a possible diminution of PMN extravasation in the ear of mice. The diminution of neutrophils extravasation as suggested by blood PMN counts was confirmed by the reduction of neutrophil content in ear of 62.4% and 82.6% following MPM and hydrocortisone treatment respectively, as measured by myeloperoxidase (MPO) ear analysis (Figure 5).

Discussion

MPM contains a variety of ingredients including whey proteins and peptides, LAB and their related exopolysaccharides, group B vitamins and calcium (Table 1). All these ingredients possess effects on the immune system such as an interesting anti-inflammatory potential [5,14,15,32,44,45]. In light of these components, the MPM is believed to possess an anti-inflammatory potential, which may be amplified by the synergy of its individual components. Previous observations suggested that the MPM could be an interesting treatment in inflammatory diseases. Indeed, it was demonstrated that MPM reduced production of cytokine TNFα in healthy rat [33]. This cytokine is very important in the development of the ACD disease and contributes in the amplification of inflammatory reaction [46]. The reduction of this pro-inflammatory cytokine following MPM consumption indicated its potential in the inhibition of development of inflammatory disease and reduction of its intensity. Moreover,

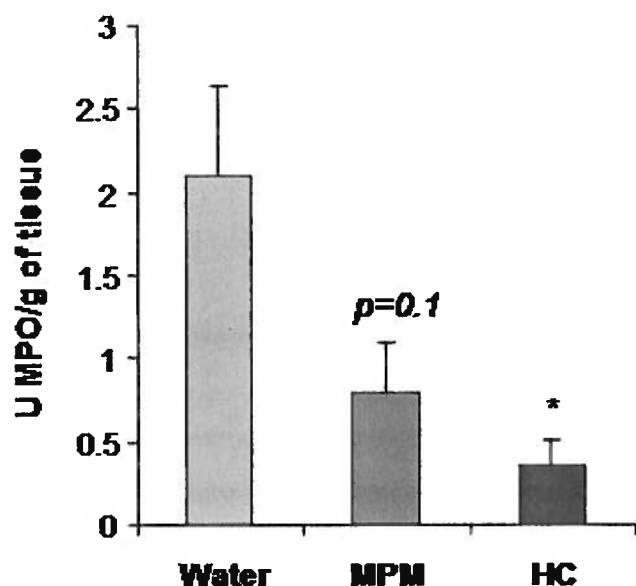


Figure 5
Myeloperoxidase (MPO) contents in ears 18 days after the first oxazolone challenge during the prophylactic ACD model. (* $p < 0.05$) (n = 10)

MPM inhibited the production of cytokines *in vitro* on CaCo2 cells stimulated with LPS [33] suggesting the inhibition of development of inflammation following an inflammatory stimulus.

The anti-inflammatory potential of MPM has been confirmed in these studies with the murine ACD model. This model of inflammation has proven to be a sensitive and useful tool to determine efficacy and potency of several anti-inflammatory and immunosuppressive drugs used in dermatological disorders such as dermatitis and psoriasis. Glucocorticoids, such as hydrocortisone, are commonly used to relieve skin and joint inflammation and have been used as a positive control group in these experiments [35]. This model comprises two important phases in order to examine inflammation: 1) Sensitization phase that is developed by application of oxazolone on the abdomen, allowing the recruitment of antigen presenting cells, which capture and present the antigen (oxazolone) to naive T lymphocytes that afterwards become active. 2) Elicitation phase developed by the application of oxazolone on the ear, which allows activation of T lymphocytes to move to the ear and recruit inflammatory cells [35,47].

MPM and hydrocortisone administered *p.o.* either in a prophylactic (Figure 1B) or a therapeutic fashion (Figure 1C) reduced the inflammation with similar efficiency as demonstrated by the reduction of ear redness and thick-

ness. In the prophylactic protocol (Figure 1B), the reduction of ear inflammation was observed as soon as one day after the first challenge and this protective effect was conserved throughout the entire course of the experiment. On the other hand, for therapeutic protocol, the anti-inflammatory effect following MPM consumption was apparent only after the second challenge (Figure 1C). The effect of MPM in this model (therapeutic protocol) showed that a certain period of time is required to overcome existing inflammation. This indicates that the MPM possesses an anti-inflammatory effect in an existing disease and is not only a preventive treatment. This therapeutic effect is interesting because those who suffer from such disease can consume MPM during crisis and will benefit of its effect. This study has shown that the reduction of inflammation by MPM consumption is not negligible as demonstrated by the comparison with hydrocortisone treatment. From that observation, we could speculate that the MPM might also exerts a beneficial effect on the reduction of skin itching and pain.

The MPM has a strong anti-inflammatory effect as demonstrated by its ability to reduce dermatological inflammation to the same extent than that of hydrocortisone. However in contrast to hydrocortisone, the MPM showed no side effects generally associated to medication including spleen atrophy, reduction in lymphocyte circulating cells or deleterious effect on body weight gain (Figures 2, 3 and 4). Hydrocortisone exerts its anti-inflammatory potential by suppression of immune cells. The reduction of inflammation observed by hydrocortisone treatment corresponded to a suppression of total immune cells (not only those implicated in inflammation), which was seen by the reduction in blood lymphocytes (Figure 4) and in spleen weight (Figure 3) for the mice consuming hydrocortisone. Consequently, people treated by hydrocortisone will be in a general immunosuppressed state and are therefore, more susceptible to contract other diseases and infection. No reduction in immune cells or spleen atrophy was observed in the mice who consumed MPM in comparison with the control water group. In fact, a trend showing immune stimulation by the MPM consumption was observed as indicated by the tendency to increase lymphocytes counts as well as spleen weight.

Atopic dermatitis is a disease that affects young children consequently, the use of hydrocortisone would not be advisable because of its inhibitory properties on growth [48]. This inhibition in growth following hydrocortisone consumption has been demonstrated in this study where the growth of these young mice treated with hydrocortisone was stopped during all the experiment (Figure 2) in comparison with mice treated with MPM and water which gained weight. Consequently, consumption of MPM by children and young adult in replacement of hydrocorti-

sone as an anti-inflammatory product would be a good alternative.

The absence of all these detrimental effects by MPM consumption suggests that the mechanism of its anti-inflammatory action is different than that of hydrocortisone. However, both hydrocortisone and MPM seem to inhibit neutrophil extravasation and accumulation in inflamed tissues as shown with a higher polymorphonuclear cells (PMN) in circulation as well as a reduced MPO content in ear (Figures 4 and 5). Results in figure 4 demonstrate an inverse correlation between inflammation and PMN counts where in the hydrocortisone and MPM groups, the blood PMN counts is higher while the ear thickness is lower than reference water group. These results are consistent with those observed for ear MPO content (Figure 5). The MPO is an enzyme exclusively present in neutrophil granules and its enzymatic activity measured in a tissue is in direct correlation of the levels of neutrophils in a tissue [42]. The MPO results showed that the neutrophil infiltration in ear of mice that received hydrocortisone and MPM is reduced compared to the mice receiving water. The blood PMN count parameter and ear MPO content could be explained by the fact that in ACD, the neutrophils (the most important group in PMN) move from blood to ear because these cells are principally responsible for inflammation [36-38]. The hydrocortisone as well as the MPM seems to prevent the neutrophil extravasation from blood to ear, reducing the ear inflammation. However, the mechanism causing this inhibition of neutrophil extravasation is different between these two groups because of the absence of immunosuppression in MPM group as seen by the absence of spleen atrophy as well as blood lymphocyte counts (Figures 3 and 4). This inhibition of neutrophil infiltration indicate that MPM will be a good candidate for the treatment or prevention of neutrophilic diseases such as, Sweet syndrome (a neutrophilic dermatose resulting of Crohn's disease complications) as well as chronic obstructive pulmonary disease [49,50].

It is previously demonstrated that MPM enhances some cytokines, blood PMN cells and glutathione production by leukocytes [33] indicating that MPM exerts a definitive immunomodulation. Its consumption could either be beneficial in a context of stimulation of innate immunity but detrimental in the context of inflammatory disease. This present study reveals the interesting properties of MPM in the reduction of inflammation confirming that despite its innate immunity stimulation potential, MPM act also as an anti-inflammatory agent. The complexity of MPM components as well as the potential synergy between its components could explain the properties of MPM to be an immunomodulatory agent as well as to be an anti-inflammatory agent in the context of inflamma-

tion. These two different immune situations suggest that MPM act through a regulatory mechanism explaining their both immunomodulatory and anti-inflammatory properties. These results demonstrate that, as a new product, the Malleable Protein Matrix reduces inflammation and immune dysfunctions when consumed orally while maintaining an appropriate immune system threshold. Experiments to demonstrate the mechanism of action responsible for the anti-inflammatory effect of the MPM consumption and other parameters to determine how specific cells are implicated and influenced by MPM consumption in this ACD model are underway.

Conclusion

MPM possesses a strong anti-inflammatory effect comparable to hydrocortisone when examined in the ACD model. The anti-inflammatory effects of consumption of MPM occur without the undesirable side effects normally associated with hydrocortisone. Therefore, MPM would be an alternative of choice for children and young adult suffering from chronic inflammatory of various diseases such as ACD. The consumption of the MPM could act as a preventive or a therapeutic nutraceutical in the case of inflammatory diseases like atopic dermatitis or related diseases such as, psoriasis. Psoriasis is a chronic inflammatory disease with similar effects on the immune system to that observed for ACD.

Competing interests

Technologie Biolactis (TB) was the industrial sponsor of a Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant obtained by INRS (CD). Collaborative research conventions and agreements intervened between TB, INRS and NSERC. INRS is a minor shareholder of TB (less than 1%) and does not have any vote. The findings of the present study are covered by a patent application (PCT CA2002/001899). JB was an on-site scholar of Fond de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and part of the scholarship was covered by TB.

Authors' contributions

JB design the animal studies, carried out the animal and other experiments, perform the statistical analysis and drafted the manuscript. CD participated in the design of animal studies, data interpretation and the statistical analysis. CD revised the manuscript for the intellectual content and language. PL participated in the design of animal studies, data interpretation and revised the manuscript for the intellectual content and language. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors wish to thank M. Roger Dubuc for the help in adaptation of the MPO enzymatic assay and Lilianne Gueerts for the help in animal studies. We also thank Drs Alain Lamarre and Denis Girard for the intellectual help in animal design as well as results interpretation. Jean-François

Lapointe revised the manuscript for the intellectual content and language and participated in data interpretation. Marie Déry has done the statistical analysis in INRS-IAF biostatistical service. This study was funded by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Strategic Grant STP 246405-1. JB was a Ph.D. scholar of Fond de recherche en santé du Québec (FRSQ)

References

- Oeser A, Chung CP, Asanuma Y, Avalos I, Stein CM: **Obesity is an independent contributor to functional capacity and inflammation in systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**:3651-3659.
- Toker S, Shirom A, Shapira I, Berliner S, Melamed S: **The association between burnout, depression, anxiety, and inflammation biomarkers: C-reactive protein and fibrinogen in men and women.** *J Occup Health Psychol* 2005, **10**:344-362.
- Bruunsgaard H: **Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation.** *J Leukoc Biol* 2005, **78**:819-835.
- Calder PC, Kew S: **The immune system: a target for functional foods?** *British Journal of Nutrition* 2002, **88**:S165-S176.
- Beaulieu J, Dupont C, Lemieux P: **Whey proteins and peptides: beneficial effects on immune health.** *Therapy* 2006, **3**:1-10.
- Laiho K, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E: **Inventing probiotic functional foods for patients with allergic disease.** *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002, **89**:75-82.
- Bounous G, Gold P: **The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione.** *Clin Invest Med* 1991, **14**:296-309.
- Kent KD, Harper WJ, Bomser JA: **Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cells.** *Toxicol In Vitro* 2003, **17**:27-33.
- Ward PP, Uribe-Luna S, Conneely OM: **Lactoferrin and host defense.** *Biochem Cell Biol* 2002, **80**:95-102.
- Kano H, Mogami O, Uchida M: **Oral administration of milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1037R-1 to DBA/1 mice inhibits secretion of proinflammatory cytokines.** *Cytotechnology* 2002, **40**:67-73.
- Kimber I, Cumberbatch M, Dearman RJ, Headon DR, Bhushan M, Griffiths CE: **Lactoferrin: influences on Langerhans cells, epidermal cytokines, and cutaneous inflammation.** *Biochem Cell Biol* 2002, **80**:103-107.
- Cross ML, Gill HS: **Modulation of immune function by a modified bovine whey protein concentrate.** *Immunol Cell Biol* 1999, **77**:345-350.
- Miyauchi H, Hashimoto S, Nakajima M, Shinoda I, Fukuwatari Y, Hayasawa H: **Bovine lactoferrin stimulates the phagocytic activity of human neutrophils: identification of its active domain.** *Cell Immunol* 1998, **187**:34-37.
- Migliore-Samour D, Roch-Arveiller M, Tissot M, Jaziri M, Keddad K, Giroud JP, Jolles P: **Effects of tripeptides derived from milk proteins on polymorphonuclear oxidative and phosphoinositide metabolisms.** *Biochem Pharmacol* 1992, **44**:673-680.
- Brix S, Bovetto L, Fritsche R, Barkholt V, Frokiaer H: **Immunostimulatory potential of beta-lactoglobulin preparations: Effects caused by endotoxin contamination.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003, **112**:1216-1222.
- Wong CW, Watson DL: **Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice.** *J Dairy Res* 1995, **62**:359-368.
- Gill HS, Doull F, Rutherford KJ, Cross ML: **Immunoregulatory peptides in bovine milk.** *Br J Nutr* 2000, **84**(Suppl 1):S111-117.
- Bounous G, Kongshavn PA: **Differential effect of dietary protein type on the B-cell and T-cell immune responses in mice.** *J Nutr* 1985, **115**:1403-1408.
- Hakansson A, Andreasson J, Zhivotovsky B, Karpman D, Orrenius S, Svanborg C: **Multimeric alpha-lactalbumin from human milk induces apoptosis through a direct effect on cell nuclei.** *Exp Cell Res* 1999, **246**:451-460.
- Matar C, Valdez JC, Medina M, Rachid M, Perdigon G: **Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant.** *J Dairy Res* 2001, **68**:601-609.
- Clare DA, Catignani GL, Swaisgood HE: **Biodefense properties of milk: The role of antimicrobial proteins and peptides.** *Current Pharmaceutical Design* 2003, **9**:1239-1255.
- Stiles ME, Holzapfel WH: **Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy.** *International Journal of Food Microbiology* 1997, **36**:1-29.
- Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E: **Probiotics: an overview of beneficial effects.** *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002, **82**:279-289.
- Clancy R: **Immunobiotics and the probiotic evolution.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2003, **38**:9-12.
- Erickson KL, Hubbard NE: **Probiotic immunomodulation in health and disease.** *J Nutr* 2000, **130**:403S-409S.
- Kitazawa H, Watanabe H, Shimosato T, Kawai Y, Itoh T, Saito T: **Immunostimulatory oligonucleotide, CpG-like motif exists in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NIAI B6.** *Int J Food Microbiol* 2003, **85**:11-21.
- Chapat L, Chemin K, Dubois B, Bourdet-Sicard R, Kaiserlian D: **Lactobacillus casei reduces CD8+ T cell-mediated skin inflammation.** *Eur J Immunol* 2004, **34**:2520-2528.
- Cross ML, Mortensen RR, Kudsk J, Gill HS: **Dietary intake of *Lactobacillus rhamnosus* HNOOI enhances production of both Th1 and Th2 cytokines in antigen-primed mice.** *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2002, **191**:49-53.
- Kopp-Hoolohan L: **Prophylactic and therapeutic uses of probiotics - a review.** *Journal of American Diet Association* 2001, **101**:229-238.
- Reddy S, Young M, Ginn S: **Immunoexpression of interleukin-1beta in pancreatic islets of NOD mice during cyclophosphamide-accelerated diabetes: co-localization in macrophages and endocrine cells and its attenuation with oral nicotinamide.** *Histochem J* 2001, **33**:317-327.
- Grimble RF: **Effect of antioxidative vitamins on immune function with clinical applications.** *Int J Vitam Nutr Res* 1997, **67**:312-320.
- Meydani SN, Ha WK: **Immunologic effects of yogurt.** *Am J Clin Nutr* 2000, **71**:861-872.
- Simard E, Pilote D, Dupont C, Lajoie N, Quet M, Lemieux P, Goyette P: **Malleable protein matrix and uses thereof.** *United States Patent #60/341* 2001.
- Beaulieu J, Dubuc R, Beaudet N, Lapointe J-F, Dupont C, Lemieux P: **Immunomodulatory potential of a malleable matrix composed of fermented whey proteins and lactic acid bacteria.** *J Med Food* 2006 in press.
- Grabbe S, Schwarz T: **Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity.** *Immunol Today* 1998, **19**:37-44.
- Romani N, Schuler G: **The immunologic properties of epidermal Langerhans cells as a part of the dendritic cell system.** *Springer Semin Immunopathol* 1992, **13**:265-279.
- Steinman RM, Witmer-Pack M, Inaba K: **Dendritic cells: antigen presentation, accessory function and clinical relevance.** *Adv Exp Med Biol* 1993, **329**:1-9.
- Bos JD, Kapsenberg ML: **The skin immune system: progress in cutaneous biology.** *Immunol Today* 1993, **14**:75-78.
- Desvignes C, Etchart N, Kehren J, Akiba I, Nicolas JF, Kaiserlian D: **Oral administration of haptens inhibits in vivo induction of specific cytotoxic CD8+ T cells mediating tissue inflammation: a role for regulatory CD4+ T cells.** *J Immunol* 2000, **164**:2515-2522.
- Dubois B, Chapat L, Goubier A, Papiernik M, Nicolas JF, Kaiserlian D: **Innate CD4+CD25+ regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8+ T cells mediating skin inflammation.** *Blood* 2003, **102**:3295-3301.
- Garrigue JL, Nicolas JF, Frangals R, Benezra C, Bour H, Schmitt D: **Optimization of the mouse ear swelling test for in vivo and in vitro studies of weak contact sensitizers.** *Contact Dermatitis* 1994, **30**:231-237.
- Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G: **Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker.** *J Invest Dermatol* 1982, **78**:206-209.
- Xia Y, Zweier JL: **Measurement of myeloperoxidase in leukocyte-containing tissues.** *Anal Biochem* 1997, **245**:93-96.
- Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Saag KG: **Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**:72-77.

45. Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P: **An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria.** *International Dairy journal* 2002, 12:163-171.
46. Xu H, Bjarnason B, Elmetts CA: **Sensitization versus elicitation in allergic contact dermatitis: potential differences at cellular and molecular levels.** *Am J Contact Dermat* 2000, 11:228-234.
47. Cavey D, Bouclier M, Burg G, Delamadeleine F, Hensby CN: **The pharmacological modulation of delayed type hypersensitivity (DTH) reactions to topical oxazolone in mouse skin.** *Agents Actions* 1990, 29:65-67.
48. Kalant H, Roschlau WHE: **Adrenocorticotrophic hormone and adrenal steroids.** In *Principles of medical pharmacology* Edited by: Decker BC. Toronto; 1989:474-482.
49. Callen JP: **Neutrophilic dermatoses.** *Dermatol Clin* 2002, 20:409-419.
50. O'Donnell R, Breen D, Wilson S, Djukanovic R: **Inflammatory cells in the airways in COPD.** *Thorax* 2006, 61:448-454.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

