

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

ÉVALUATION DU POTENTIEL IMMUNOMODULATEUR DE L'EPS ISOLÉ DE
LA SOUCHE *LACTOBACILLUS KEFIRANOFACIENS* INIX

Par
Anik Boudreau

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maîtrise en sciences (M. Sc.) en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et examineur interne	François Shareck INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Lucie Lamontagne Université de Montréal
Directeur de recherche	Claude Dupont INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

La matrice polysaccharidique des grains de kéfir est composée de kéfiran, un exopolysaccharide (EPS) majoritairement produit par la bactérie *Lactobacillus kefiranofaciens*. La souche INIX de *Lb. kefiranofaciens*, isolée à partir de grains de kéfir dans notre laboratoire, sécrète une grande quantité d'EPS. Le premier objectif des travaux qui sont présentés dans ce mémoire est de définir la nature de l'EPS produit par la souche INIX. Le deuxième objectif est d'évaluer le potentiel immunomodulateur de l'EPS, via le profil de cytokines induites lors de tests de stimulation cellulaires *in vitro* et *ex vivo*, sur une lignée de macrophage murin (RAW 264,7) ainsi que sur des splénocytes murins.

L'EPS a été soumis à différentes analyses afin de déterminer sa composition atomique, ses liaisons glycosidiques (H-RMN) et la nature de ses sous-unités mono-saccharidiques (HPLC). Les résultats obtenus ont mené à l'hypothèse que l'EPS produit par INIX serait un kéfiran mannosylé à environ 10%.

Afin de caractériser le potentiel immunomodulateur de l'EPS, il a été ajouté dans le milieu de culture d'une lignée de macrophages murins (RAW 264,7) pendant 24 heures. L'EPS (1 et 10 µg/ml) n'a pas stimulé la transcription d'IL-1, une cytokine pro-inflammatoire, contrairement au LPS (0,1 et 1 µg/ml), un contrôle positif de stimulation, qui a induit une forte expression d'IL-1. D'autre part, l'EPS (50 µg/ml) a stimulé l'expression d'IL-12 chez les splénocytes murins, après 24 heures de stimulation, tout comme les contrôles positifs de stimulation (LPS 0,1 µg/ml, ConA 5 µg/ml).

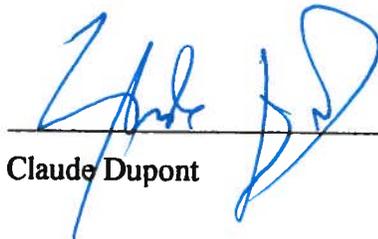
Par ailleurs, le gavage de souris BALB/C avec une solution d'EPS 1% pendant 10 jours consécutifs a augmenté la synthèse d'IL-18 dans l'iléon de ces mêmes souris. L'IL-12 et l'IL-18 sont deux cytokines, produites entre autres par des cellules du système immunitaire (SI) inné, qui favorisent la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en cellules T_H1. Afin de vérifier si l'effet de l'EPS d'INIX était systémique, les splénocytes des souris gavées ont été mis en culture et 3 cytokines ont été quantifiées par ELISA après 24 et 48 heures de stimulation en présence d'IL-2 (5 ng/ml) et de ConA (5 µg/ml). Les splénocytes isolés de souris gavées à l'EPS sécrètent moins d'IL-4, d'IL-10 et d'IFN-γ murin que les splénocytes isolés de souris gavées à l'eau.

Il est donc proposé que l'EPS, en activant le SI inné de façon non spécifique (production d'IL-12 et d'IL-18), favorise un profil de différenciation T_H1 . Cette hypothèse est renforcée par le fait que les splénocytes isolés de souris gavées à l'EPS sécrètent moins d'IL-4 et d'IL-10 que ceux isolés de souris gavées à l'eau. En effet, ces deux cytokines induisent la différenciation des lymphocytes $CD4^+$ vers un profil T_H2 et elles sont de plus sécrétées par les cellules T_H2 différenciées. Étant donné que l'EPS ne fait qu'amorcer le processus de différenciation, il est normal que la production d'IFN- γ n'ait pas été augmentée, car c'est une cytokine sécrétée en situation inflammatoire par les cellules T_H1 différenciées.

Certaines expériences sont finalement proposées pour confirmer que l'EPS d'INIX peut effectivement amorcer la différenciation vers un profil T_H1 , ainsi que certaines perspectives d'application d'un tel produit dans l'industrie.



Anik Boudreau



Claude Dupont

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche Claude Dupont, pour la confiance qu'il m'a accordée, tant pour la réalisation des travaux et l'orientation du projet que pour la gestion du temps. Il a fait preuve d'une compréhension remarquable qui m'a finalement permis de terminer ce projet de recherche, malgré ma situation assez particulière. Je veux également remercier Pierre Lemieux, PDG de Technologie Biolactis, et Alain Lamarre, professeur à l'Institut, pour leurs apports précieux concernant le côté immunologique de mon projet. Je remercie aussi François Shareck pour sa coopération dans différents aspects techniques, ainsi que Marcel Desrosiers pour son aide en cytométrie. Je veux aussi dire merci à Roger Dubuc, pour son aide technique, sa patience, son souci de toujours bien expliquer le pourquoi de chaque étape expérimentale et finalement, pour les nombreuses tranches de vie qui pimenteraient mes journées. Il faut également que je dise un gros merci aux deux techniciennes en santé animale, Liliane et Kathie, pour avoir fait des manipulations qui, je dois l'avouer, m'ont causé bien des soucis.

Je tiens également à remercier tous les étudiants de l'équipe avec qui j'ai travaillé. Tous autant que vous êtes, vous avez su créer une ambiance agréable de travail, où l'entraide et la coopération étaient de mise. J'aimerais dire un merci particulier à Nicolas Beudet, qui a mis beaucoup de vie dans notre laboratoire, qui m'a donné de précieux conseils et qui a toujours pris le temps de m'aider et de me prêter une oreille attentive lorsque j'en ai eu besoin. Également, un énorme merci à Josée Beaulieu pour sa grande expertise, son temps et sa gentillesse. J'ai beaucoup apprécié travaillé avec vous tous.

Finalement, un énorme merci à Mathieu, l'amour de ma vie, qui a toujours été là pour moi, pour me soutenir dans les périodes plus difficiles, mais aussi pour partager les bons moments. Qui s'est montré compréhensif pendant si longtemps sur le fait que j'avais très peu de temps à lui consacrer, car j'étais surchargée de travail. Je te suis extrêmement reconnaissante de m'avoir soutenue et remonté le moral quand j'étais épuisée, pendant ces dernières années où le travail a pris le dessus sur notre vie.

Merci à vous tous

Anik

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Programme d'élu­tion permettant la séparation des résidus monosaccharidiques qui composent l'EPS d'INIX	53
Tableau 2 : Programme utilisé pour amplifier l'IL-1 par PCR	56
Tableau 3 : Rendements de production et composition de différents lots d'EPS	64
Tableau 4 : Pourcentage de certains atomes des lots d'EPS ABE1 et ABE2b et du kéfiran	65
Tableau 5 : Proportion relative des résidus monosaccharidiques qui composent l'EPS de chacun des trois lots testés.	67
Tableau 6 : Liaisons présentes dans l'EPS d'INIX	68

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Formule détaillée d'une sous-unité répétitive du kéfiran	17
Figure 2 : Différenciation d'une cellule souche myéloïde de la moelle osseuse	26
Figure 3 : Profil HPLC type après hydrolyse acide de l'EPS lot ABE1	66
Figure 4 : Spectre H-RMN pour l'analyse des liens entre les monosaccharides de l'EPS lot ABE1	68
Figure 5 : Profil de migration d'ADNc amplifié avec des amorces mIL-1 et GAPDH, obtenu par transcription inverse d'ARN total, extrait de RAW 264,7 stimulés 24 heures avec différents produits	69
Figure 6 : Migration sur gel d'agarose 0,9% (p/v) de l'ADN amplifié avec des amorces IL-12m et GAPDH, obtenu par transcription inverse d'ARN extrait de splénocytes stimulés avec différents produits pendant 24 hres	70
Figure 7 : Dosage par ELISA d'IL-18 murin dans l'iléon de souris BALB/C gavées 10 jours avec une solution de 5ml/kg/jour soir d'eau, soit d'EPS 1% (p/v) lot ABE1	71
Figure 8 : Production d'IL-4 par des splénocytes isolés de souris BALB/C gavées pendant 10 jours et ensuite stimulés en culture avec 5 ug/ml de ConA et 1,25 ng/ml d'IL-2	73
Figure 9 : Production d'IL-10 par des splénocytes isolés de souris BALB/C gavées pendant 10 jours et ensuite stimulés en culture avec 5 ug/ml de ConA et 1,25 ng/ml d'IL-2.....	74
Figure 10 : Production d'IFN- γ par des splénocytes isolés de souris BALB/C gavées pendant 10 jours et ensuite stimulés en culture avec 5 ug/ml de ConA et 1,25 ng/ml d'IL-2	75

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC-1 :	β -(1,4)-D-glucan branché avec des résidus glucosyl, un EPS produit par <i>Acetobacter xylinum</i>
<i>ad libitum</i> :	À volonté
ADNc :	ADN complémentaire
BCR :	Récepteur antigénique de la cellule B (<i>B Cell Receptor</i>)
BrEt :	Bromure d'éthidium
BSF1 :	Facteur stimulant la croissance des cellules B (<i>B-cell Stimulatory Factor1</i>)
CD :	Cellule dendritique
CDC :	Cytotoxicité dépendante du complément (<i>Complement-Dependent Cytotoxicity</i>)
CLR :	Récepteur lectine de type-C
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CNRC-ISB :	Conseil national de recherches Canada - Institut des sciences biologiques
ConA :	Concanavaline A
CPA :	Cellule présentatrice d'antigène
CR :	Récepteur du complément
CRD :	Domaine qui reconnaît les glucides (<i>Carbohydrate Recognition Domain</i>)
CTL :	Lymphocyte T cytotoxique (<i>Cytotoxic T Lymphocytes</i>)
DMEM :	<i>Dulbecco's Modified Eagle Media</i>
ELISA :	Essai d'un immunoabsorbant lié aux enzymes (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EPS :	Exopolysaccharide
FAE :	Épithélium associé aux follicules (<i>Follicle Associated Epithelium</i>)
FOS :	Fructo-oligosaccharide
GALT :	Tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (<i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i>)
GC-MS :	Spectrométrie de Masse par Chromatographie Gazeuse
GRAS :	Généralement reconnu sans danger (<i>Generally Recognized As Safe</i>)
HSV :	Herpes Simplex Virus type I

IFN :	Interféron
<i>i.g.</i> :	Intragastrique (gavage)
Ig :	Immunoglobuline
IgA _s :	IgA sécrétoires
IL :	Interleukine
iNOS :	Oxyde nitrique synthase inductible (<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
<i>i.p.</i> :	Intra péritonéale
<i>i.v.</i> :	Intra veineux
ITAM:	Motif de tyrosine qui active le SI (<i>ImmunoTyrosine Activatory Motif</i>)
LAB :	Bactérie lactique (<i>Lactic Acid Bacteria</i>)
LAK :	Lymphocyte tueur activé (<i>Lymphocyte Activated Killer</i>)
LCR :	Région qui contrôle l'expression d'un locus (<i>Locus Control Region</i>)
LFA-1 :	Intégrine à la surface d'un leucocyte (<i>Leukocyte Function-Associated Antigen 1</i>)
LNT :	Lentinan
LPS :	Lipopolysaccharide
LTA :	Acide lipotéichoïque
MALT :	Tissu lymphoïde associé aux muqueuses
MAP3K8 :	Protéine MAP kinase kinase kinase 8 (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 8</i>)
MPO :	Myéloperoxydase
MR :	Récepteur du mannose
NK :	Cellules tueuses naturelles (<i>Natural Killer cells</i>)
NKSF :	Facteur stimulant les cellules NK (<i>Natural Killer Stimulatory Factor</i>)
NO :	Oxyde nitrique (<i>Nitric Oxide</i>)
PALS :	Gaine lymphoïde périartériolaire (<i>Periarteriolar Lymphoid Sheath</i>)
PAMP :	Patrons moléculaires particuliers chez les pathogènes reconnus par les PRR (<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>)
PBMC :	Cellules mononuclées du sang périphérique (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PHA-P :	Phytohémagglutinine-P

p/p :	Poids/poids
PRR :	Récepteur reconnaissant des patrons particuliers chez les pathogènes (<i>Pattern Recognition Receptor</i>)
p/v :	Poids/volume
RCW :	Milieu de culture pour les bactéries lactiques (<i>Rogosa Cheese Whey</i>)
SCFA :	Acides gras à courtes chaînes (<i>Short Chain Fatty Acids</i>)
SI :	Système Immunitaire
SPG :	Schizophyllan
STAT :	Transducteur de signal et activateur de la transcription (<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>)
TLR :	Récepteurs homologues à la famille des protéines Toll chez la drosophile (<i>Toll Like Receptor</i>)
TMB :	3,3',5,5' tetramethylbenzidine
TNF :	Facteur nécrosant des tumeurs (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TP :	Température pièce
v/v :	Volume/volume

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS	iv
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
TABLE DES MATIÈRES	x
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : revue bibliographique	3
1. Les exopolysaccharides.....	3
1.1 Composition chimique.....	3
1.2 Caractéristiques fonctionnelles des EPS.....	4
1.2.1 Utilités pour la bactérie productrice.....	4
1.2.2 Utilités pour l'homme.....	5
1.2.2.1 Utilités industrielles.....	5
1.2.2.2 Allégations santé.....	6
1.2.2.3 Potentiel immunomodulateur des EPS.....	7
1.2.2.3.1 Les β -glucan.....	8
1.3 Synthèse et dégradation.....	11
2. <i>Lb. kefiranofaciens</i>	12
3. Grains de kéfir.....	13
3.1 Le kéfir.....	16
4. Récepteurs qui lient les glucides sur les cellules présentatrices d'antigène.....	18
4.1 Récepteurs qui lient les opsonines Fc γ R et CR.....	18
4.2 Récepteur reconnaissant des patrons particuliers chez les micro-organismes.....	19
4.2.1 Récepteurs homologues aux toll (TRL).....	19
4.2.2 Récepteurs lectines de type-c (CLR).....	20
4.2.2.1 Récepteurs transmembranaires de type I.....	21
4.2.2.1.1 Récepteur du mannose (MR).....	22
4.2.2.1.2 Récepteur dectin-1.....	23
4.2.2.1.3 Récepteur dectin-2.....	23
4.2.2.1.4 Récepteur langerin (CD207).....	24
5. Le système immunitaire (SI).....	25
5.1 Les macrophages intestinaux.....	27
5.2 Différenciation des lymphocytes T CD4 ⁺ (T _H 1 vs T _H 2).....	29
5.2.1 Les lymphocytes T CD4 ⁺ T _H 1.....	31
5.2.2 Les lymphocytes T CD4 ⁺ T _H 2.....	32
5.3 L'organisation structurale et fonctionnelle du SI.....	33
5.3.1 La rate.....	34

5.3.2	Le SI du tractus gastro-intestinal	35
5.3.2.1	Les plaques de peyer.....	37
5.4	Les cytokines.....	38
5.4.1	L'IL-1	38
5.4.2	L'IL-4	39
5.4.3	L'IL-10	41
5.4.4	L'IL-12	42
5.4.5	L'IL-18	44
5.4.6	L'IFN- γ	45
6.	Objectifs de travail.....	46

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODE

1.	Production et caractérisation physique et chimique de l'exopolysaccharide	47
1.1	Production	47
1.1.1	Souche bactérienne.....	47
1.1.2	Production de biomasse	47
1.1.3	Purification et conservation de l'EPS	48
1.2	Caractérisation physique	49
1.2.1	Fractionnement par poids moléculaire	49
1.3	Caractérisation chimique	49
1.3.1	Dosage des sucres dans l'EPS par la méthode de Dubois	50
1.3.2	Dosage des protéines dans l'EPS par la méthode de Lowry	50
1.3.3	Analyse élémentaire	51
1.3.4	HPLC	52
1.3.5	H-RMN	53
2.	Évaluation du potentiel immunomodulateur <i>in vitro</i>	54
2.1	RAW 264,7	54
2.1.1	Origine et mise en culture	54
2.1.2	Immunostimulation	54
2.1.3	Extraction d'ARN total	55
2.1.4	Transcription inverse	56
2.1.5	PCR sur l'IL-1 (réaction de polymérisation en chaîne)	56
2.1.6	Gel d'agarose 0.9%	57
2.2	Splénocytes	58
2.2.1	Isolement des cellules	58
2.2.2	Immunostimulation des cellules en culture	59
2.2.3	Extraction d'ARN total, RT-PCR pour l'IL-12 et gel d'agarose 0,9%.....	59
3.	Évaluation du potentiel immunomodulateur <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i>	60
3.1	Modèle murin de gavage	60
3.2	Iléon	60
3.3	Splénocytes	61
3.4	ELISA	62

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

1.	Production et caractérisation physique et chimique de l'exopolysaccharide	64
1.1	Rendements et contenu	64
1.2	Fractionnement par poids moléculaire	65

1.3	Analyse élémentaire	65
1.4	HPLC	66
1.5	H-RMN	67
2.	Évaluation du potentiel immunomodulateur de l'EPS <i>in vitro</i>	69
2.1	Cellules macrophagiques RAW 264,7	69
2.2	Splénocytes	70
3.	Évaluation du potentiel immunomodulateur de l'EPS <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i>	71
3.1	Iléon (<i>in vivo</i>)	71
3.2	Splénocytes (<i>ex vivo</i>)	72
3.2.1	IL-4, IL-10 et IFN- γ	72
CHAPITRE 4 : DISCUSSION		76
CONCLUSION		89
LISTE DES RÉFÉRENCES		91
ANNEXES		106
ANNEXE 1 : Milieu RCW (<i>Rogosa Cheese Whey</i>)		107
ANNEXE 2 : Dosage des protéines (Lowry)		108
ANNEXE 3 : Eau DEPC		109
ANNEXE 4 : Transcription inverse		110
ANNEXE 5 : PCR		111
ANNEXE 6 : Gel d'agarose 0,9% (p/v)		112
ANNEXE 7 : ACK		114
ANNEXE 8 : Amorces		115

INTRODUCTION

Les EPS produits par les bactéries lactiques (LAB) forment une classe de composés aux fonctionnalités multiples, qui sont utilisés dans divers domaines de l'industrie alimentaire et pharmaceutique, pour ne nommer que ceux-là. Les EPS contribuent en effet à améliorer la texture et les perceptions gustatives des denrées comestibles, grâce à leurs qualités rhéologiques, qui les rendent attrayants pour servir de substituts de matières grasses, d'agents épaississeurs et stabilisateurs, de gélifiants, d'émulsifiants, d'inhibiteurs de synérèse ou même de denrées alimentaires.

De plus, certains EPS synthétisés par les LAB apporteraient des effets santé bénéfiques lorsqu'ils sont utilisés comme prébiotiques ou comme additifs pour rendre un aliment fonctionnel. Il est probable que ces effets positifs soient entre autres attribuables au potentiel immunomodulateur des EPS, c'est-à-dire à leur capacité d'interagir directement ou indirectement avec le système immunitaire (SI), pour stimuler ou inhiber certains aspects spécifiques de la réponse de l'hôte.

Les grains de kéfir sont composés d'un consortium symbiotique de LAB, de bactéries acétiques et de levures, fermement imbriqués dans une matrice polysaccharidique visqueuse. Cette matrice est composée majoritairement de kéfiran, un EPS dont la sécrétion est attribuable en grande partie à la bactérie lactique *Lb. kefiranofaciens*. Les pays d'Europe de l'Est confèrent aux grains de kéfir des allégations santé depuis des centaines d'années. Récemment, différentes équipes de recherche ont rapporté certaines évidences concernant le potentiel immunomodulateur des grains de kéfir et du kéfiran. C'est pourquoi l'objet principal des recherches présentées dans ce mémoire est l'évaluation du potentiel immunomodulateur de l'EPS produit par la souche INIX de *Lb. kefiranofaciens*. Cette souche est isolée de grains de kéfir et elle sécrète l'EPS en grandes quantités. Il est proposé que l'EPS produit par INIX est du kéfiran ou s'y apparente, et qu'il ait donc la possibilité de moduler le SI.

Avant d'analyser le potentiel immunomodulateur de l'EPS, il est important d'établir une méthode de production et de purification efficace de l'EPS, suivie d'une caractérisation physique et chimique. Pour ce faire, différentes méthodes de purification seront évaluées et la composition de l'EPS produit sera ensuite déterminée par un dosage des sucres (Dubois), un dosage protéique (Lowry), un fractionnement par poids moléculaire, une analyse élémentaire, une analyse des sous-unités monosaccharidiques (HPLC) et finalement, une analyse des liaisons glycosidiques (H-RMN).

Afin de caractériser le potentiel de l'EPS, des expériences de stimulation seront réalisées sur des cellules immunocompétentes, d'abord *in vitro* sur une lignée de macrophages murins et sur une culture primaire de splénocytes. Ensuite *ex vivo*, sur des splénocytes isolés de souris BALB/C préalablement gavées pendant 10 jours consécutifs avec une solution composée soit d'eau (contrôle négatif de stimulation), soit de β -glucan 1% poids/volume (p/v) (contrôle positif de stimulation), soit d'EPS 1% (p/v). Pour déterminer la nature immunomodulatrice de l'EPS, le niveau d'expression de certaines cytokines sera évalué par une réaction de RT-PCR, tandis que d'autres cytokines seront quantifiées par ELISA dans les surnageants de culture. Les cytokines qui favorisent un profil de différenciation T_H1 et T_H2 , ainsi que les cytokines sécrétées par ces deux types cellulaires seront analysées afin d'évaluer si l'EPS favorise l'engagement dans un profil plutôt qu'un autre. Ainsi, les cytokines suivantes seront analysées, soit l'IL-1, l'IL-4, l'IL-10, l'IL-12, l'IL-18 et l'IFN- γ .

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les exopolysaccharides

1.1 Composition chimique

Les propriétés intrinsèques des polysaccharides sont entre autres définies par leur charge, leur poids moléculaire, leur rigidité, leurs chaînes latérales ainsi que par la nature des sous unités monosaccharidiques qui les composent et les liaisons qui unissent ces sous unités (Jolly, Vincent et al. 2002). Chez la bactérie, ils sont majoritairement utilisés pour l'élaboration de la paroi cellulaire et la capsule, lorsqu'il y en a une. On nomme les polysaccharides structuraux attachés de façon permanente à la capsule des polysaccharides capsulaires, alors que les polysaccharides sécrétés dans le milieu, sous la forme d'une couche visqueuse et indépendante de la paroi et de la capsule, sont appelés exopolysaccharides (EPS) (Cerning 1990). Toutefois, certains auteurs parlent d'EPS comme étant un regroupement de ces deux familles (De Vuyst et Degeest 1999).

Il existe deux groupes d'EPS qui diffèrent de par leur composition, i.e. les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides. Les homopolysaccharides sont des polymères composés d'un seul type de résidus monosaccharidiques répétés, qui sont reliés par des liaisons homogènes ou variées. Par exemple, le dextran et le mutan sont deux α -glucans dont la chaîne principale est respectivement formée de liaisons α -(1-6) et α -(1-3). Ces deux monopolysaccharides comportent des ramifications de branchement en position 2, 3 ou 4. Le β -glucan est aussi un monopolysaccharide de glucose, mais ses sous unités sont reliées par des liaisons β -(1,3), β -(1,4) ou β -(1,6), tout dépendant de l'organisme producteur.

Quant aux hétéropolysaccharides, ce sont des polymères formés par la répétition d'un oligosaccharide, composé de trois à sept résidus qui contient au moins deux résidus de nature différente. Cet oligosaccharide est répété un nombre variable de fois, ce qui permet l'obtention de chaînes qui peuvent atteindre plus d'un million de daltons (Ceming 1990). Le kéfiran, un glucogalactane ramifié, est un exemple d'hétéropolysaccharide.

1.2 Caractéristiques fonctionnelles des EPS

1.2.1 Utilités pour la bactérie productrice

Les polysaccharides membranaires sont reconnus pour jouer plusieurs rôles importants chez les bactéries comme l'attachement, la reconnaissance cellulaire via des lectines, la virulence, la formation de biofilms et la résistance au stress (De Vuyst et Degeest 1999). Cela soulève la question du rôle encore obscur que les polysaccharides sécrétés dans le milieu pourraient exercer, car ils sont coûteux en énergie à produire. Certaines hypothèses ont été postulées. Pham *et al.* postulent que les EPS synthétisés par les bactéries lactiques (LAB) sont davantage des produits mineurs déviés de la glycolyse que des métabolites secondaires (Pham, Dupont et al. 2000). Dans la plupart des environnements naturels, le style de vie prédominant des micro-organismes est de s'associer avec une surface en formant des biofilms. Les EPS pourraient donc ainsi permettre de coloniser des niches écologiques. Les EPS pourraient aussi être un moyen de défense des LAB contre les phages, car ils en préviendraient l'adsorption (Lamothe, Jolly et al. 2002). Ils protégeraient aussi les bactéries contre la prédation par les protozoaires, dessiccation, la phagocytose, les antibiotiques et les composés toxiques et antimicrobiens comme les ions métalliques, le dioxyde de soufre, le cuivre, l'éthanol et la nisine (De Vuyst et Degeest 1999; Looijesteijn, Trapet et al. 2001). Finalement, il est peu probable que les EPS servent de réserve de nourriture, car la plupart des LAB ne possèdent pas les enzymes pour métaboliser les EPS qu'ils produisent (De Vuyst et Degeest 1999). Il existe bien sûr quelques exceptions, comme *Lactobacillus rhamnosus*, qui produit des glycohydrolases pour dégrader ses propres EPS afin d'en diminuer la concentration en phase stationnaire (Pham, Dupont et al. 2000).

1.2.2 Utilités pour l'homme

1.2.2.1 Utilités industrielles

Les exopolysaccharides sont généralement des polymères stables, non toxiques, hydrophiles, gélifiant et biodégradables (Sinha et Kumria 2001). Toutes ces caractéristiques leurs ont permis d'occuper une grande importance dans le domaine alimentaire; ils peuvent être soit endogènes (présents dans la membrane ou la paroi des micro-organismes présents dans la nourriture), soit être produits *in situ* (ex : produits laitiers fermentés par des LAB) ou encore ajoutés en tant qu'additif pour leurs propriétés rhéologiques (EPS 10).

Il existe une variété de polysaccharides couramment utilisés dans l'industrie de l'alimentation comme additifs, qui sont produits par les plantes (cellulose, pectine, amidon (Van Calsteren, Pau-Roblot et al. 2002), gomme de caroube et de guar (De Vuyst et Degeest 1999)), les algues (agar, alginate, carragénine) et les bactéries (dextran, gellan, pullulane, xanthane) (Sutherland 1998). Il faut toutefois noter que la plupart de ces polysaccharides sont modifiés chimiquement avant d'être ajoutés comme additif.

Ce sont les propriétés rhéologiques très intéressantes des EPS qui sont à l'origine de leur utilisation si répandue dans l'industrie alimentaire. Effectivement, ils peuvent servir de substituts de matières grasses, d'agent épaississeur et stabilisateur, de gélifiant, d'émulsifiant, d'inhibiteur de synérèse ou encore de denrées alimentaires en soi (De Vuyst et Degeest 1999). Les EPS contribuent donc à améliorer la texture et les perceptions gustatives des denrées comestibles.

Par ailleurs, l'utilisation des polysaccharides est loin d'être exclusive à l'alimentation. En effet, l'industrie pharmaceutique, biomédical, métallurgique et pétrolière les exploitent également (Cerning 1990).

1.2.2.2 Allégations santé

Certains EPS synthétisés par les LAB apporteraient des effets santé bénéfiques lorsqu'ils sont utilisés comme additif alimentaire fonctionnel (Jolly, Vincent et al. 2002), i.e. un supplément qui, lorsqu'il est ajouté à un aliment, procure des bienfaits physiologiques et (ou) réduit le risque de maladies chroniques au-delà des fonctions nutritionnelles de base (définition d'Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC) en 2002). Par exemple, certains EPS peuvent être transformés par la microflore du côlon en acides gras à courtes chaînes (SCFA : *Short Chain Fatty Acids*), qui procurent de l'énergie aux cellules épithéliales du côlon, et qui pourraient même exercer un effet protecteur contre le cancer colorectal (Roberfroid 2005). Les EPS qui ne subissent pas de dégradation pourraient aussi conférer une certaine protection contre le cancer colorectal, en augmentant le volume des fèces ou en absorbant spécifiquement les produits cancérogènes (Topping et Illman 1986).

Plusieurs EPS sont également étudiés pour leur caractère prébiotique, i.e. un composé non digestible par l'homme, mais qui peut affecter avantageusement sa santé en stimulant sélectivement la croissance ou l'activité de sa microflore (Gibson, Beatty et al. 1995). Les prébiotiques sur lesquels le plus d'effort et d'attention sont portés actuellement sont des oligosaccharides indigestibles contenant certains des monosaccharides suivants : glucose, galactose, fructose, mannose et xylose. Une récente étude sur le sujet mentionne que pour qu'un produit soit considéré comme prébiotique, il doit être consommé à 4 g/jour (Gibson 1998). Certains prébiotiques stimulent la production de butyrate par la microflore bactérienne. Ce produit favorise le maintien de l'intégrité mucosale en fournissant de l'énergie à la flore microbienne intestinale, en stimulant la maturation et la régénération de l'épithélium et en exerçant un effet antitumoral (Le Blay, Michel et al. 1999). Les fructo-oligosaccharides (FOS) figurent parmi les oligosaccharides indigestibles les plus étudiés, car en plus de stimuler la production de butyrate, ils induisent aussi la synthèse de SCFA, ce qui favorise le développement des LAB et augmente conséquemment la concentration d'acide lactique (Le Blay, Michel et al. 2003). L'acide lactique produit par les LAB diminue le pH du milieu, ce qui leur confère un avantage compétitif par rapport aux micro-organismes

pathogènes présents dans le tube digestif, car elles sont adaptées aux milieux acides. En tant que substrat des LAB, les prébiotiques stimulent donc l'acidification du milieu. Les LAB peuvent également sécréter de l'acide acétique, du dioxyde de carbone, du peroxyde d'hydrogène, de l'éthanol, du diacétyl et des bactériocines qui pourraient être bénéfiques pour l'hôte, car ces composés préviendraient les désordres gastro-intestinaux et les infections vaginales (Zamfir, Callewaert et al. 1999; Messens et De 2002; Jamuna et Jeevaratnam 2004).

1.2.2.3 Potentiel immunomodulateur des EPS

Un immunomodulateur est un composé capable d'interagir directement ou indirectement avec le système immunitaire (SI) pour stimuler ou inhiber certains aspects spécifiques de la réponse de l'hôte. De nombreux facteurs influencent l'impact stimulateur ou inhibiteur qu'un immunomodulateur exerce sur le SI. En effet, la dose, la voie et le moment d'administration, le mécanisme d'action du composé et le site de ce mécanisme sont autant de facteurs qui peuvent influencer l'incidence d'une telle molécule (Tzianabos 2000).

Dans les dernières années, différentes équipes de recherche ont rapporté que certains polysaccharides exerceraient un effet immunomodulateur sur les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigènes, comme les monocytes et les macrophages (Tzianabos 2000). Hosono, Tanabe et al. (2003) rapportent que les FOS, un prébiotique administré oralement à des souris BALB/C pendant 6 semaines induisent l'immunorégulation des plaques de Peyer en stimulant la production d'immunoglobulines A sécrétoires (IgA_s) et en stimulant la production de cytokines dont l'IFN- γ . Ruiz-Bravo et al. (2001) ont montré que l'EPS isolé du bacille *Paenibacillus jamilae* CP-7, administré par voie intra péritonéale (*i.p.*), améliore la résistance des souris BALB/C à *Listeria monocytogenes*. Ils proposent une piste de mécanisme d'action qui passerait par l'augmentation de la prolifération lymphocytaire, qu'ils ont confirmée *in vitro* (Ruiz-Bravo, Jimenez-Valera et al. 2001). La prolifération des splénocytes en culture a aussi été rapportée entre autres par Duan, Qiao et al. en 2001 avec quatre polysaccharides isolés

de la plante *Lycium barbarum* et par Chen, Li et al. en 2003 avec deux polysaccharides isolés des herbes chinoises astragale et achyranthe.

Il a également été prouvé que *Lb. rhamnosus* sécrète un polysaccharide qui stimule l'expression de certaines cytokines par les splénocytes et les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) (Chabot, Yu et al. 2001). De plus, Nakajima H. *et al.* ont montré que l'EPS produit par une autre espèce de *Lactobacillus*, soit *Lb. lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495, augmente la réponse humorale lors de l'immunisation de souris (Nakajima, Toba et al. 1995).

Par ailleurs, plusieurs études ont été effectuées sur le polysaccharide isolé de la plante *Aloès vera*, l'acemannan. Ce polysaccharide semble stimuler l'activité des macrophages en augmentant leur production d'oxyde nitrique (NO) et de cytokines comme l'interleukine 6 (IL-6) et le facteur α nécrosant des tumeurs (TNF- α) (Ramamoorthy, Kemp et al. 1996; Zhang et Tizard 1996).

1.2.2.3.1 Les β -glucan

Les β -glucans sont des homopolymères de glucose reliés par des liaisons β et synthétisés par les champignons et les levures. Plusieurs groupes de recherche ont démontré le pouvoir immunostimulant de cette grande famille de polysaccharides. Par exemple, le β -(1,4)-D-glucan branché avec des résidus glucosyl (AC-1), un EPS produit par *Acetobacter xylinum*, induit la production de TNF- α et de la sous-unité p40 de l'IL-12 par les macrophages stimulés *in vitro*, via l'engagement du récepteur TLR4 (*Toll Like Receptor 4*). L'administration orale d'AC-1 à des souris, deux jours avant et deux jours après l'inoculation *i.p.* de *Listeria monocytogenes*, augmente le taux de survie de ces souris et retarde la croissance bactérienne de façon significative. De plus, l'AC-1 augmente les taux sérique de la sous-unité p40 de l'IL-12 ainsi que la réponse CD4⁺ T_H1 et CD8⁺ Tc1 contre *Listeria monocytogenes*. Donc AC-1 pourrait prévenir le processus infectieux en stimulant la production d'IL-12, via TLR4, ce qui stimule la réponse T_H1, dirigée contre les micro-organismes intracellulaires (Li, Yajima et al. 2004).

De plus, l'administration orale de β -(1,3)-(1,4)-glucan isolé de l'avoine semble augmenter l'activité antivirale des macrophages, ce qui explique la diminution de la mortalité de souris infectées par injection intranasale à l'herpes simplex virus de type I (HSV-1) (Davis, Murphy et al. 2004). La même équipe de recherche a également fait ressortir que le β -glucan isolé de l'avoine diminue l'étendue des métastases suite à l'injection intra veineuse (*i.v.*) d'une lignée cellulaire tumorale (B16), probablement en augmentant la cytotoxicité des macrophages. Un autre groupe de recherche travaillant également sur le β -(1,3)-(1,4)-glucan isolé de l'avoine a constaté qu'il augmente la résistance aux infections causées par *Staphylococcus* chez la souris, en augmentant encore une fois le pouvoir phagocytaire des macrophages et le nombre de splénocytes producteurs d'IFN- γ (Yun, Estrada et al. 2003).

Par ailleurs, Inoue, Kodama et al. (2002) ont étudié un β -glucan extrait du champignon *Grifola jirondosa*. Ils ont mis en évidence que cet EPS exerce une activité antitumorale, en plus de stimuler l'immunité cellulaire, en diminuant l'activation des lymphocytes B et en potentialisant l'activation des lymphocytes T_H. Ce β -glucan augmente aussi la production d'IFN- γ , d'IL-18 et de la sous-unité p70 de l'IL-12 par les splénocytes et les ganglions lymphatiques, en plus de supprimer l'expression d'IL-4. Ces résultats suggèrent donc l'induction d'une réponse T_{H1}, ce qui corrobore l'induction de l'immunité cellulaire et permet d'expliquer le potentiel anti-tumoral du β -glucan. Effectivement, il empêche le développement du carcinome, dont la population dominante est de type T_{H2}, en favorisant une réponse de type T_{H1}. De plus, plusieurs groupes de recherches japonais ont fait des études cliniques et animales sur le schizophyllan (SPG), un autre EPS fongique, produit par *Schizophyllum commune* Fries. Toutes ces recherches semblent démontrer que le SPG stimulerait la production de certaines cytokines dont l'IFN- γ et l'IL-2 par des leucocytes en culture (Sakagami, Mizoguchi et al. 1988; Kakumu, Ishikawa et al. 1991) en plus d'exercer un effet synergique bénéfique dans plusieurs cancers dont le carcinome cervical (Miyazaki, Mizutani et al. 1995), le cancer du côlon (Fujimoto, Furue et al. 1991) et le carcinome squameux (Arika, Amemiya et al. 1992; Nakano, Oka et al. 1996).

La famille des β -(1,3)-glucans, isolés des champignons et levures, possède un pouvoir anti-infectieux très large, probablement grâce à ses propriétés immunomodulatrices (Bleicher et Mackin 1995; Williams, Mueller et al. 1998). Plusieurs ont démontré que ces polysaccharides se lient aux récepteurs de surface des leucocytes et qu'ils peuvent ainsi stimuler toute une gamme de réponses immunitaires, incluant la sécrétion de cytokines (Doita, Rasmussen et al. 1991), la génération de molécules oxydatives et de NO (Sakurai, Kaise et al. 1997).

Les β -glucans peuvent lier le récepteur du complément de type 3 (CR3 : CD11b-CD18), plus particulièrement à la région C-terminale du CD11b qui compose le CR3. Cette liaison sensibilise la cellule qui porte le CR3, ce qui lui permet d'effectuer une dégranulation cytotoxique efficace, lorsque le CR3, via le domaine I dans la portion N-terminale du CD11b, se liera au C3b (Ross 2000). L'engagement du CR3 par C3b mène à l'activation d'un mécanisme anti-tumoral efficace, soit la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) par dégranulation, mais seulement lorsque CR3 a préalablement été sensibilisé, par exemple par le β -glucan. Les cellules tumorales sont souvent recouvertes de C3b, mais ce n'est pas suffisant pour entraîner leur destruction (Vetvicka, Thornton et al. 1996; Xia, Vetvicka et al. 1999). Par contre, il a été établi que le β -(1,3)-(1,4)-glucan isolé de l'orge, administré oralement en combinaison avec le rituximab *i.v.*, un anticorps qui reconnaît le CD20 à la surface de certaines tumeurs, empêche la croissance de lymphome sous-cutané non-Hodgkinien, probablement via l'activité adjuvante du β -glucan qui permet l'activation du CDC (Modak, Koehne et al. 2005). Le même groupe de recherche a également démontré l'effet synergique du β -glucan avec toute une gamme d'anticorps anti-tumoraux utilisés dans le traitement de différentes tumeurs (Cheung et Modak 2002; Cheung, Modak et al. 2002). Un autre groupe de recherche a également montré que le lentinan (LNT), un β -(1,3)-glucan branché en β -(1,6) isolé du champignon *Lentinula edodes*, pouvait annuler la prédominance des cellules T_H2 impliquées dans le cancer du système digestif en favorisant une réponse T_H1. Ils concluent que l'injection *i.v.* de 2 mg de LNT 3x/semaine peut rétablir une balance adéquate T_H1 / T_H2 (Yoshino, Tabata et al. 2000). D'ailleurs, certains croient que le pouvoir antitumoral des β -glucans serait dû à la présence de liaisons de branchement en position 1-6 (Wasser 2002).

1.3 Synthèse et dégradation

La synthèse des exopolysaccharides par les bactéries lactiques n'est pas toujours couplée à la croissance bactérienne de la même façon. Par exemple, les LAB thermophiles produisent majoritairement leur EPS lors de leur phase exponentielle de croissance. Par contre, les bactéries mésophiles sécrètent généralement davantage d'EPS lorsque les conditions deviennent moins favorables, donc lors de leur phase stationnaire (De Vuyst et Degeest 1999). Les gènes responsables de la synthèse des EPS sont habituellement retrouvés sur un plasmide chez les LAB mésophiles, tandis qu'ils sont d'origine chromosomique chez les LAB thermophiles. La production d'EPS par une bactérie lactique est une caractéristique instable qui peut se perdre à travers les générations (Cerning 1990).

Il existe une très grande variabilité dans la susceptibilité à la dégradation pour les EPS. Il a été montré que les EPS synthétisés par certaines LAB (*S. thermophilus* Sfi 39 et Sfi 12) sont assez facilement dégradables, étant donné que leur structure répétitive ne contient qu'un seul résidu branché, soit un beta-galactosyl. Par contre, les EPS produits par d'autres LAB (*Lb. lactis ssp. cremoris* B40, *Lb. sakei* 0-1, *S. thermophilus* SFi20 et *Lb. helveticus* Lh59) sont difficilement dégradables, car leur structure contient deux résidus branchés, un chargé et l'autre non. La double substitution diminue grandement l'accessibilité des enzymes digestives aux EPS (Sutherland 1998).

2. *Lb. kefiranofaciens*

Lb. kefiranofaciens est le principal producteur de kéfiran dans les grains de kéfir (Frengova, Simova et al. 2002). Cette souche bactérienne a été isolée pour la première fois par Fujisawa, Adachi et al. en 1988 et par la suite décrite par Arihara, Toba et al. en 1990. C'est une bactérie Gram + en forme de bâtonnet rugueux moyen-long, encapsulée, anaérobie facultative, non mobile, catalase négative, qui ne forme pas de spore et qui mesure 0,4-1,0 µm par 3,5-20 µm. Après une croissance de dix jours sur gélose, les colonies sont rugueuses, visqueuses, ont un diamètre de 4,0 mm et sont d'un blanc translucide. Sa température de croissance optimale se situe entre 30-37°C et sa croissance est inhibée en dessous de 15°C et au-dessus de 45°C (Arihara, Toba et al. 1990).

De part son produit principal de fermentation, *Lb. kefiranofaciens* est une bactérie homofermentaire appartenant aux LAB, qui se caractérisent par leur capacité à convertir plusieurs sources de carbone en acide lactique (Cerning 1990). *Lb. kefiranofaciens* peut fermenter le glucose, le galactose, le mannose, le fructose, le maltose, le lactose, le melibiose, le sucrose et le raffinose, mais pas l'arabinose, le xylose, le ribose, le rhamnose, la cellobiose, le tréhalose, le mélézitose, le mannitol, le sorbitol, l'esculine, l'amygdaline et la salicine (Arihara, Toba et al. 1990). Les LAB peuvent également convertir une certaine proportion de leur source de carbone en exopolysaccharides (Cerning 1990).

Les bactéries lactiques sont depuis longtemps utilisées dans l'alimentation. Effectivement, elles peuvent servir de préservatif grâce à l'acidification du milieu que leur métabolisme entraîne, inhibant ainsi la croissance de micro-organismes contaminants. Les LAB sont reconnues, ainsi que les produits qu'elles synthétisent pour être généralement sécuritaires (GRAS, *generally recognized as safe*). Certaines pourraient également stimuler les fonctions de la barrière immunitaire (Salminen, Bouley et al. 1998).

3. Grains de kéfir

Les grains de kéfir sont composés d'un consortium symbiotique de bactéries lactiques (LAB), de bactéries acétiques et de levures, fermentés dans une matrice polysaccharidique visqueuse (Rimada et Abraham 2001; Frengova, Simova et al. 2002). La nature de la microflore ainsi que la proportion de ses composantes varient en fonction de la zone géographique d'isolement des grains. Historiquement, les premiers grains de kéfir auraient été isolés dans la région des montagnes caucasiennes, qui s'étend de la mer Noire à la mer Caspienne (Rodrigues, Carvalho et al. 2005). En moyenne, les grains ont un diamètre qui varie entre 0,1 et 4 cm, une forme irrégulière rappelant le chou-fleur et un aspect gélatineux et blanchâtre (Rimada et Abraham 2001);(Arihara, Toba et al. 1990). La matrice formant la structure des grains de kéfir est composée de kéfiran, un glucogalactane branché et soluble, contenant un rapport de D (+) glucose et de D (+) galactose de 1 : 1,22. Le kéfiran représente au moins 24% du poids sec des grains (Micheli, Uccelletti et al. 1999). Cet hétéropolysaccharide a été isolé et décrit pour la première fois par La Rivière et Kooiman en 1967. Les interactions des micro-organismes, autant entre eux qu'avec la matrice, créent un microenvironnement qui est essentiel à la propagation des grains (Simova, Beshkova et al. 2002).

On retrouve plus de 40 espèces différentes de LAB dans les grains de kéfir, dont les principales appartiennent au genre *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Les LAB représentent de 83-90% de la microflore de ces grains et les levures 10-17%. La microflore active des grains de kéfir est mise à profit dans le domaine alimentaire pour fermenter une variété de produits, dont le plus répandu est le kéfir. L'arôme et de la saveur de ce yogourt acide, pétillant et très légèrement alcoolisé sont majoritairement conférés par les levures et non par les bactéries, comme ceux de tous les aliments issus de la fermentation des grains de kéfir d'ailleurs (Simova, Beshkova et al. 2002).

Des allégations santé sont conférées au kéfir et à ses grains depuis des milliers d'années, surtout en Russie, en Asie et en Europe. Malheureusement, la majorité des rapports scientifiques sur le kéfir ne sont pas traduits en anglais et sont donc peu connus de la population occidentale. Il est certain que les recherches sur le sujet se concentrent encore aujourd'hui dans ces régions du monde, mais le folklore qui entoure cette "boisson miraculeuse" a également soulevé l'intérêt des scientifiques occidentaux, qui commencent à publier de plus en plus d'évidences scientifiques qui démystifient le kéfir. Entre autres, l'association entre une équipe de recherche canadienne et argentine a permis de montrer que l'administration orale à volonté (*ad libitum*) de différentes concentrations de kéfir, pasteurisé ou non, module de manière dose dépendante le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (GALT : *Gut Associated Lymphoid Tissue*) des souris BALB/C. Effectivement, le kéfir augmente les taux d'IgA_s, mais sans affecter la morphologie normale du petit intestin, et le kéfir pasteurisé stimule les cytokines des profils T_{H1} et T_{H2} (Vinderola, Duarte et al. 2005). L'effet adjuvant exercé par le kéfir sur la stimulation de l'immunité mucoale avait déjà été montré chez les rats en 2001 par une autre équipe de recherche (Thoreux et Schmucker 2001).

Plusieurs études ont démontré que le lait fermenté par des grains de kéfir et les grains eux-mêmes exerçaient une action microbicide sur différents genres et souches bactériens, majoritairement Gram +, dont les *cocci*, les *Staphylococcus*, les *bacillus* Gram +, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* (43/58 souches), *Listeria monocytogenes* (28/58 souches), *Salmonella typhimurium* (10/58 souches), *S. enteritidis* (22/58 souches), *S. flexneri* (36/58 souches) et *Yersinia enterocolitica* (47/58 souches). Cet effet des LAB sur d'autres bactéries potentiellement pathogènes s'explique entre autres par leur production de nombreuses substances microbicides énumérées à la fin de la section 1.2.2.2 du chapitre 1, dont les bactériocines. (Serot, Dousset et al. 1990; Cevikbas, Yemni et al. 1994; Brialy, Rivalland et al. 1995; Garrote, Abraham et al. 2000; Santos, San Mauro et al. 2003).

Une équipe brésilienne a aussi montré que le kéfir et le kéfiran favorisent la cicatrisation des plaies cutanées chez les rats (Rodrigues, Caputo et al. 2005). Ils ont de plus démontré que le kéfir et le kéfiran diminuent le processus inflammatoire qui mène à l'œdème, lors d'expérimentations où une ouate imbibée d'agent pro-inflammatoire (ex : l'histamine) est introduite chez le rat (Rodrigues, Carvalho et al. 2005). Ils ont également étudié un breuvage appelé le champignon tibétain qui est un peu à l'image du kéfir. En effet, il est fermenté par des grains composés d'une douzaine de souches bactériennes et de levures qui vivent en symbiose, encapsulées dans une matrice polysaccharidique qu'ils sécrètent. Cette boisson exercerait aussi un potentiel anti-inflammatoire dans des essais similaires à ceux effectués avec le kéfir (Diniz, Garla et al. 2003).

Plusieurs études ont également été faites sur le potentiel anti-tumoral du kéfir (lait fermenté), du kéfiran et des grains de kéfir. Une équipe de recherche japonaise a entre autres montré l'inhibition des métastases d'un mélanome induit par l'injection de cellules tumorales B16. Leurs conclusions suggèrent que les micro-organismes du kéfir stimulent l'activité des cellules tueuses naturelles (NK : *natural killer*), alors que le kéfiran active la sécrétion de lymphokines par les macrophages stimulés via la stimulation du GALT (Furukawa, Yokokawa et al. 1993; Furukawa, Matsuoka et al. 2000). De plus, Kubo *et al.* ont rapporté que le kéfir inhibe la prolifération du carcinome d'Ehrlich en 1992. D'autres groupes proposent que les souches bactériennes et/ou le kéfiran stimulent l'apoptose des cellules tumorales et que c'est ce mécanisme qui permet d'inhiber la croissance du sarcome 180 chez les souris (Liu, Wang et al. 2002).

D'autres chercheurs ont montré que certains genres bactériens isolés des grains de kéfir (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*) exerçaient leurs propriétés antimutagènes en se liant à des composés mutagènes, comme la pyrolysine (un acide aminé retrouvé fréquemment dans la nourriture) et le 2-nitrofluorène (Hosono, Tanabe et al. 1990; Miyamoto, Morita et al. 1991; Yoon, Cho et al. 1999).

Le kéfir pourrait également agir en tant qu'antioxydant. En effet, des souris exposées au tétrachlorure de carbone, une toxine qui entraîne l'oxydation des tissus hépatiques, ont développé des niveaux rénal et hépatique plus faibles de malondialdéhyde (dérivé oxydé) lorsqu'elles avaient été gavées au kéfir (Güven et Gulmez 2003).

3.1 Le kéfiran

Certaines études ont été faites sur le polysaccharide principal isolé des grains de kéfir, dont la formule détaillée de la sous-unité répétitive, rapportée par Micheli L. *et al.*, 1999 est présentée à la figure 1.

Dans les années 1980, des japonais ont étudié le potentiel antitumoral du kéfiran, donné de façon orale ou *i.p.*, et ils ont montré qu'il pouvait réduire la croissance du carcinome d'Ehrlich, du Sarcome 180 et inhiber la formation de métastases dans le carcinome du poumon de Lewis, probablement en stimulant une réponse immunitaire cellulaire (Shiomi, Sasaki *et al.* 1982; Murofushi, Shiomi *et al.* 1983; Murofushi, Mizuguchi *et al.* 1986; Furukawa, Iiyama *et al.* 1992). Effectivement, comme le kéfiran n'est pas toxique pour les lignées tumorales *in vitro*, les chercheurs suggèrent que le kéfiran exerce son action *in vivo* en rejoignant directement la rate et le thymus, ou indirectement en stimulant le GALT. La même équipe de recherche a également marqué l'EPS donné aux souris avec du tritium et a retrouvé lors de l'autopsie le marqueur dans la majorité des organes murins, ce qui rend possible une action directe du kéfiran sur les organes lymphoïdes secondaires. La capacité du kéfiran à moduler une réponse immunitaire a également été rapportée par Furukawa, Iiyama *et al.* en 1992. Cette même équipe de recherche a aussi incubé des plaques de Peyer isolées de souris cancéreuses avec le kéfiran. Ils ont ensuite incubé des splénocytes et des thymocytes de souris saines avec le surnageant de cette première culture et ont observé que le surnageant stimulait la prolifération des cellules et augmentait le pouvoir mitogène du lipopolysaccharide (LPS) et de la phytohémagglutinine-P (PHA-P) sur ces mêmes cellules, ce que le kéfiran seul ne provoquait pas (Furukawa, Takahashi *et al.* 1996).

Il a déjà été montré par différents groupes de recherches que d'autres polysaccharides peuvent aussi agir comme agent antitumoral. Par exemple, le polysaccharide isolé de la plante *Lycium barbarum* (LBP) exerce un effet antitumoral, probablement en augmentant le nombre de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ qui s'infiltrent au niveau des tumeurs et les combattent (He, Ying *et al.* 2005).

L'EPS étudié dans ce projet est produit par une souche pure de *Lb. kefiranofaciens* isolée de grains de kéfir.



6(2)

↑

1

Glc

Figure 1 : Formule détaillée d'une sous-unité répétitive du kéfiran (Micheli 1999)

4. Récepteurs qui lient les glucides sur les cellules présentatrices d'antigène

Cette section présente des récepteurs susceptibles de reconnaître l'EPS en circulation entier ou partiellement dégradé.

4.1 Récepteurs qui lient les opsonines FcγR et CR

Un des rôles importants des glucides est d'assurer la reconnaissance du soi et du non-soi avec des patrons particuliers (McGreal, Martinez-Pomares et al. 2004). Le système immunitaire inné est formé de composantes cellulaires et humorales qui sont capables de reconnaître certains patrons conservés présents à la surface des micro-organismes. Les cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles sont les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B. Les CPA possèdent des récepteurs à leur surface qui doivent faire la différence entre les antigènes du soi et du non-soi, afin de ne pas induire de réponses auto-immunes. Il y a des récepteurs de CPA qui reconnaissent des particules ou des micro-organismes opsonisés, c'est-à-dire dont la surface a été modifiée afin de faciliter la phagocytose par les macrophages ou les neutrophiles (Taylor, Martinez-Pomares et al. 2005). Les opsonines peuvent être des immunoglobulines (Ig) dont la partie Fc est reconnue par des FcγR lorsqu'ils sont liés à des antigènes, ou une molécule du complément, reconnue par les récepteurs du complément (CR) lorsqu'ils sont liés à un antigène (Ehlers 2000; Garcia-Garcia et Rosales 2002; Hart, Smith et al. 2004)

4.2 Récepteur reconnaissant des patrons particuliers chez les micro-organismes

Il y a aussi des récepteurs de CPA qui reconnaissent des molécules non-opsionisées, comme les PRR (*Pattern Recognition Receptor*) qui reconnaissent des motifs précis sur les micro-organismes appelés PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). Les PAMPs sont formés d'une variété de molécules incluant des protéines, des lipides et des glucides (Janeway 1989). Parmi les PRR, citons les deux familles de récepteurs les mieux connues, soit les TLR (récepteurs homologues aux Toll) et les CLR (récepteurs lectines de type C). Une interaction entre un PAMP et un TLR ou un CLR entraîne la maturation de la CPA et sa migration des les ganglions lymphatiques, afin qu'elle présente aux cellules T l'antigène dérivé du peptide qu'elle a phagocyté (McGreal, Miller et al. 2005).

4.2.1 Récepteurs homologues aux Toll (TLR)

Dix TLR ont aujourd'hui été identifiés, dont le TLR2 qui reconnaît l'acide lipotéichoïque (LTA) des bactéries Gram + et le TLR4 qui reconnaît le LPS, une composante de la paroi des bactéries Gram -. La liaison entre un TLR et son ligand entraîne le plus souvent l'activation d'une cascade inflammatoire, dû à l'activation du facteur de transcription NF- κ B, qui permet au SI inné et adaptatif d'éliminer le micro-organisme envahissant (Takeda, Kaisho et al. 2003). Les TLRs influencent le développement de la réponse immunitaire adaptative en activant les CPA qui elles jouent un rôle crucial dans l'induction des réponses de type T_H1 et T_H2 (Dabbagh et Lewis 2003; McGreal, Miller et al. 2005).

4.2.2 Récepteurs lectines de type-C (CLR)

Les lectines regroupent l'ensemble des récepteurs de glucides chez les mammifères (McGreal, Martinez-Pomares et al. 2004). Les récepteurs de type C sont une famille de lectines dont la liaison avec leur ligand dépend de la présence de calcium. Toute une variété de glycoprotéines endogènes contiennent aussi des résidus mannose et galactose, donc la simple reconnaissance via un type de résidu est insuffisante, c'est pourquoi la structure 3D et les autres types d'interactions (ex: hydrogènes) sont également importantes pour différencier le soi du non-soi. Les récepteurs sont habituellement oligomérisés, pour augmenter leur affinité envers leurs ligands (Weis, Crichlow et al. 1991)

4.2.2.1 Récepteurs transmembranaires de type I

Dans la famille des CLR, il existe différentes classes, dont les récepteurs transmembranaires de type I, qui possèdent plusieurs domaines qui reconnaissent les glucides (CRD : *Carbohydrate Recognition Domain*). Toutefois, la majorité de ces CRD reconnaissent leur ligand indépendamment du calcium et conséquemment, ces ligands ne sont pas tous des glucides. Il existe évidemment quelques exceptions dont le récepteur dectin-1, dont les CRD lient les glucides indépendamment du calcium. Chaque CRD est formé d'environ 150 acides aminés formant une poche hydrophobe qui accueille les glucides et permet l'intervention du calcium (Vales-Gomez, Reyburn et al. 2000). Ces récepteurs reconnaissent certains motifs sur les micro-organismes, ils sont donc impliqués dans la reconnaissance du non soi lors de la réponse immunitaire innée, mais ils reconnaissent aussi des ligands endogènes. Effectivement, les CLR interviennent dans les interactions cellule-cellule de la réponse immunitaire, ainsi que dans la tolérance immunitaire et dans le recyclage des glycoprotéines endogènes produites lors de réponse immunitaire, ce qui permet à l'organisme de revenir en homéostasie lorsque l'infection est résolue. Étant donné que les CLR reconnaissent différents types de ligands (exogènes et endogènes), ils ne doivent pas toujours induire la même réponse. Donc, la fonction de chaque récepteur est dépendante (McGreal, Martinez-Pomares et al. 2004; McGreal, Miller et al. 2005) :

- De la cellule sur laquelle le récepteur est exprimé et du moment auquel il est exprimé (ex: à quel niveau de différenciation la cellule est-elle rendu?)
- Du niveau d'expression de récepteur
- Du degré de multimérisation des récepteurs
- Du contexte dans lequel l'antigène est reconnu par le récepteur, i.e. présence ou absence de signaux inflammatoires sur d'autres récepteurs (ex: TLR).

4.2.2.1.1 Récepteur du mannose (MR)

Le récepteur du mannose reconnaît des glucides sulfatés sur des glycoprotéines endogènes via son domaine N-terminal riche en cystéines, un domaine indépendant du CRD (Fiete, Beranek et al. 1998). Donc le MR peut reconnaître à la fois des glycoprotéines endogènes et des motifs glucidiques sur un micro-organisme. Il reconnaît des ligands qui portent des résidus mannoses terminaux, par exemple les mannanes des levures et des parois bactériennes, ou des résidus fucoses et N-acétylglucosamines terminaux, et non à l'intérieur de la molécule. Le MR est exprimé sur les macrophages, les cellules dendritiques (CD) et les cellules endothéliales (McGreal, Miller et al. 2005), mais pas sur les neutrophiles et les monocytes (Janeway, Travers et al. 2001). Son expression est augmentée par l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 et la prostaglandine E (PGE), et diminuée par l'interféron- γ (IFN- γ) et le LPS. La liaison du MR avec son ligand active la production d'IL-1 β , d'IL-6, de GM-CSF, de TNF- α et d'IL-12 (Aderem et Underhill 1999). Le complexe MR/ligand est internalisé et dirigé dans la voie endocytaire où le ligand est digéré pour être présenté via le complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH-II) ou par le CD1, un CMH-I non classique qui présente des glycolipides, des lipoprotéines ou des lipides. Le MR est rapidement recyclé à la surface cellulaire. Il peut aussi être clivé et se retrouver alors sous forme soluble. Toutefois, le rôle majeur du MR semble davantage ciblé au niveau du recyclage des glycoprotéines endogènes libérées lors de la réaction inflammatoire, comme les hydrolases lysosomiales (Stahl, Rodman et al. 1978), l'activateur tissulaire du plasminogène (Smedsrod, Einarsson et al. 1988) et la myéloperoxydase (MPO) dérivée des neutrophiles (Shepherd et Hoidal 1990). Le MR est donc essentiel pour assurer l'homéostasie de la réponse inflammatoire en internalisant et en dégradant ces molécules, ce qui protège l'hôte contre une autodestruction. (McGreal, Martinez-Pomares et al. 2004).

4.2.2.1.2 Récepteur Dectin-1

Le dectin-1 est présent à la surface des monocytes, des macrophages et des neutrophiles. Son expression est activée par l'IL-4 et l'IL-13. Le dectin-1 est un récepteur de type II unique, car il possède des motifs de tyrosine qui activent le SI (ITAM : *ImmunoTyrosine Activatory Motif*) dans sa queue cytoplasmique. Les ITAM interagissent avec TRL2, qui initie alors une cascade d'activation intracellulaire qui mène à la production de médiateurs pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1. Les motifs ITAMs sont également nécessaires, indépendamment de TLR2, pour induire les réarrangements du cytosquelette qui permettent la phagocytose du complexe dectin-1/ligand. Ce récepteur reconnaît les liaisons β -1,3 et β -1,6 dans les polymères de glucose (glucan), des types de liaison surtout retrouvés chez les champignons (Brown et Gordon 2001), mais également dans l'EPS produit par INIX (β -1,6). Lorsque le dectin-1 lie des petits ligands, par exemple le laminarin, le récepteur est recyclé à la surface cellulaire, mais lorsqu'il lie des ligands plus volumineux, par exemple le zymosan, son expression à la surface est diminuée. On ne connaît pas encore le mécanisme qui entraîne cette diminution (East et Isacke 2002). Le dectin-1 interagit aussi avec des ligands endogènes. Il peut lier un ligand, jusqu'ici inconnu, sur les lymphocytes T activés et stimuler leur prolifération lors d'une 2^e rencontre avec l'antigène (Ariizumi, Shen et al. 2000).

4.2.2.1.3 Récepteur Dectin-2

Ce récepteur est exprimé sur certaines populations cellulaires seulement, soit les macrophages, les cellules de Langerhans et les CD retrouvés dans la rate, les ganglions lymphatiques et le thymus (Ariizumi, Shen et al. 2000). Le dectin-2 pourrait lier des résidus mannoses retrouvés autant sur les micro-organismes que sur les cellules T régulatrices CD4⁺ CD25⁺ (Aragane, Maeda et al. 2003)

4.2.2.1.4 Récepteur Langerin (CD207)

Ce récepteur, nommé également CD207, est lui aussi exprimé sur une gamme de cellules restreintes, soit les cellules de Langerhans et les CD de la rate et des ganglions lymphatiques. Il reconnaît préférentiellement les résidus mannosés, fucosés et N-acétylglucosamines, autant sur des molécules endogènes qu'exogènes. Le complexe ligand/langerin est rapidement internalisé, mais il n'est pas dirigé dans la voie lysosomiale et donc les ligands ne sont pas présentés sur le CMH-II. Le complexe est dirigé dans un compartiment spécifique aux cellules de Langerhans dont on ne connaît pas encore très bien la fonction : les granules Birbeck (Valladeau, Ravel et al. 2000).

5. Le système immunitaire (SI)

Le SI est le système de défense de l'organisme. Il se divise en deux, soit le SI inné et le SI acquis ou adaptatif. Le rôle du SI inné est de reconnaître et d'éliminer les micro-organismes nocifs et les macromolécules nuisibles. Les cellules effectrices de ce système sont les macrophages, les neutrophiles, les éosinophiles et les cellules tueuses naturelles (NK). Celles-ci réagissent rapidement (quelques minutes), en reconnaissant des patrons communs à de nombreux micro-organismes, qui ont été conservés au cours de l'évolution (PAMPs). Toutefois, le fait de réagir seulement à des structures prédéterminées limite la diversité des ligands reconnus par ces récepteurs, appelés PRR. Pour compenser cette lacune, le SI inné interagit avec le SI acquis qui lui agit beaucoup plus lentement (plusieurs heures ou jours), mais reconnaît une diversité très étendue d'épitopes protéiques, en plus de conserver une mémoire immunologique qui lui permet de réagir plus rapidement lors d'une deuxième rencontre du déterminant antigénique. Les cellules effectrices du SI acquis sont les lymphocytes B et T, dont les récepteurs spécifiques à l'antigène sont uniques et non prédéterminés, car ils résultent d'une recombinaison génétique efficace entre plusieurs gènes (Janeway, Travers et al. 2001; Smith, Ochsenbauer-Jambor et al. 2005).

Toutes les cellules immunitaires sont issues d'une même cellule souche myéloïde de la moelle osseuse, dont la réplication et la différenciation sont dirigées par différents facteurs de croissance. La figure 2 présente un résumé de ce processus.

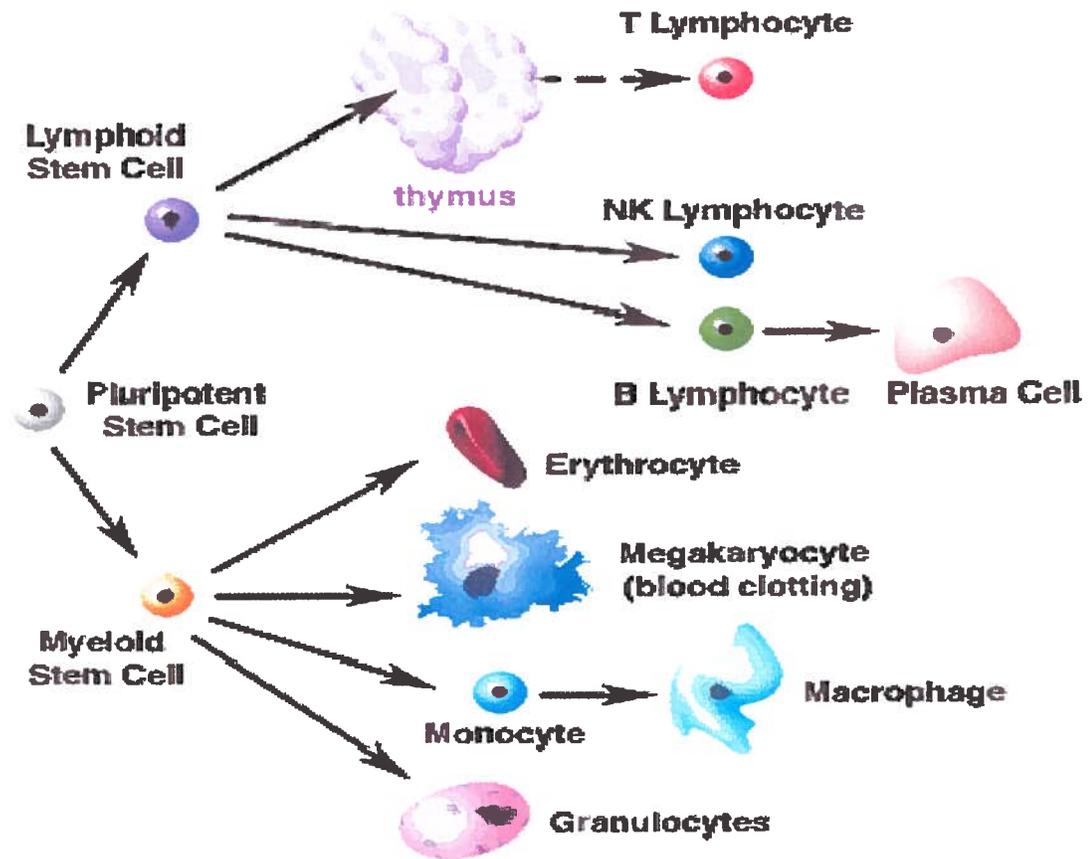


Figure 2 : Différenciation d'une cellule souche myéloïde de la moelle osseuse
<http://www.biology.arizona.edu/immunology/tutorials/immunology/02t.html>

5.1 Les macrophages intestinaux

Les monocytes recrutés par la *lamina propria* acquièrent un phénotype différent des autres macrophages résidents dans les tissus. En effet, ils n'expriment pas de récepteurs aux LPS, IgA, IgG, CR3, CR4, LFA-1 (intégrine), aux facteurs de croissance IL-2, IL-3, aux chémokines CCR5, CXCR4 et aux ligands chémo-attractants f-Met-Leu-Phe et C5a (Li, Meng et al. 1999; Meng, Sellers et al. 2000; Smythies, Sellers et al. 2005). L'absence de ces récepteurs à la surface des macrophages intestinaux entraîne des changements fonctionnels importants. Par exemple, parce qu'ils n'expriment pas les récepteurs CD14 et CD89, ces macrophages ne peuvent répondre ni au LPS, ni aux IgA. Cela constitue en réalité une particularité intéressante du fait que ces cellules résident dans un environnement très riche en LPS et en IgA. L'absence de réponse à ces deux facteurs de stimulation implique que la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- α) normalement exprimées suite à une telle stimulation n'a pas lieu. Cela évite donc que la muqueuse intestinale soit continuellement inflammée, même si elle est en contact constant avec des éléments du non-soi, comme la nourriture et les MO. Donc, ni la phagocytose, ni le contact avec des facteurs de stimulation solubles n'induisent l'initiation du processus inflammatoire chez les macrophages intestinaux, contrairement aux macrophages résidents dans d'autres tissus (Smith, Smythies et al. 2001; Smythies, Sellers et al. 2005). L'anergie inflammatoire acquise par les macrophages intestinaux normaux implique également l'absence de synthèse de cytokines co-stimulatrices, telles IL-1, IL-10 et IL-12, qui stimulent les lymphocytes T auxiliaires. Les cellules dendritiques intestinales, localisées également dans la *lamina propria*, agissent donc en tant que principales cellules présentatrices d'antigènes dans la muqueuse intestinale (Kelsall, Leon et al. 2005).

En tant qu'effecteur cellulaire principal du tractus gastro-intestinal, les macrophages intestinaux jouent un rôle fondamental dans la défense de l'hôte tant au niveau de la reconnaissance et de la phagocytose que de l'élimination des micro-organismes (Smith, Ochsenbauer-Jambor et al. 2005). Ils expriment entre autres à leur surface une famille de récepteurs hautement conservés appelés TLR (*Toll Like Receptor*), des récepteurs homologues à la famille des protéines Toll chez la drosophile. La liaison de ces protéines transmembranaires avec leurs ligands mène à l'activation des gènes impliqués dans l'immunité innée (Aderem et Ulevitch 2000; Means, Golenbock et al. 2000). Les macrophages intestinaux restent également des phagocytes extrêmement efficaces, tant au niveau de l'ingestion de micro-organismes, de matériels inertes et de cellules apoptotiques que de l'élimination intracellulaire de ces débris (Smythies, Sellers et al. 2005).

5.2 Différenciation des lymphocytes T CD4⁺ (T_{H1} vs T_{H2})

C'est lors de l'expansion clonale qui suit la première rencontre avec l'antigène que la décision de la voie de différenciation est prise, soit T_{H1} ou T_{H2}. Les cellules T CD4⁺ naïves rencontrent d'abord leur antigène, le plus fréquemment présenté sur le CMH-II d'une CD. Cette rencontre stimule l'expression de l'IL-2 et de son récepteur de haute affinité, ce qui mène à l'activation et à la prolifération de la cellule T, ainsi qu'à sa différenciation en T_{H0} effectrice immature. Les éléments qui déterminent ensuite la voie de différenciation des cellules CD4⁺ ne sont pas encore tous connus, mais il a été démontré que les éléments suivants du contexte immunologique jouaient un rôle important : les cytokines présentes, la force et la qualité des molécules de co-stimulation impliquées dans l'induction de la réponse et finalement, l'intensité et la nature du complexe TCR / peptide-CMH-II (Leitenberg et Bottomly 1999; Noble, Thomas et al. 2001; Schaeffer, Yap et al. 2001).

De tous ces facteurs, les cytokines semblent exercer le rôle le plus important, surtout l'IL-12 et l'IL-4, qui détermine respectivement la différenciation des cellules T_{H0} en T_{H1} et T_{H2}. Les autres facteurs semblent surtout impliqués dans le processus qui mènera à la sécrétion d'une cytokine plutôt qu'une autre. Les cellules T_{H1} et T_{H2} ne sont pas des phénotypes pré-engagés, mais plutôt la finalité d'un processus de différenciation incluant de nombreuses étapes (Murphy, Ouyang et al. 2000; Romagnani 2004). La décision de se différencier en cellule CD4⁺ T_{H1} et non en T_{H2} se prend plus tôt au cours du processus, donc les cytokines sécrétées par les cellules impliquées dans l'immunité innée sont primordiales dans l'orientation de la réponse (Janeway, Travers et al. 2001).

Il est également essentiel de faire ressortir les rôles antagonistes que jouent les cellules T_{H1} et T_{H2}, dont les actions s'inhibent réciproquement (Janeway, Travers et al. 2001). Effectivement, l'IFN- γ sécrété par les cellules T_{H1} inhibe la différenciation des cellules T naïves en cellules T_{H2} et l'IL-4 sécrétée par les cellules T_{H2} exerce la même action, mais à l'inverse. De concert avec l'IL-10 et l'IL-13, l'IL-4 inhibe en plus la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, ainsi que l'activation du potentiel microbicide des macrophages. C'est pourquoi dans tout organisme en homéostasie, ces deux profils coexistent en se maintenant mutuellement en équilibre (Finkelman et Urban 2001).

Lorsqu'un déséquilibre survient entre les profils T_H1 et T_H2 , cela entraîne différents problèmes, peu importe le sens du déséquilibre. Par exemple, un excès de cellules T_H1 peut être responsable de certaines maladies auto-immunes comme les scléroses multiples ou l'arthrite rhumatoïde, tandis qu'un excès de cellules T_H2 mène à des maladies comme l'asthme et certaines allergies atopiques (Lucey, Clerici et al. 1996; Romagnani 2000).

L'acétylation des histones autour desquelles l'ADN est enroulé est une étape préalable à la transcription d'un gène. Il a été démontré que les lymphocytes $T CD4^+ T_H1$ et T_H2 ont des patrons d'acétylation différents. Toutefois, ces patrons peuvent changer si l'environnement change ; une cellule effectrice T_H1 peut se différencier en cellule T_H2 si elle est stimulée par des cytokines qui stimulent ce profil et inversement. Les cellules $CD4^+$ ont donc une mémoire, maintenue entre autres par les patrons d'acétylation des histones, mais celle-ci est flexible (Messi, Giacchetto et al. 2003).

5.2.1 Les lymphocytes T CD4⁺ T_H1

La production de cellules T CD4⁺ T_H1 mène à une immunité de type cellulaire. Effectivement les cellules T CD4⁺ T_H1 ont pour principales fonctions l'activation de l'état microbicide des macrophages, l'expansion clonale des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ effecteurs (CTL), l'induction de la sécrétion d'IgG et la sécrétion de cytokines et de chimiokines qui attirent les cellules au site d'infection. L'activation du profil T_H1 est également accompagnée de l'activation des cellules NK (Jankovic, Liu et al. 2001).

Pour être activés, les macrophages ont besoin de deux signaux : l'IFN- γ , une cytokine sécrétée par les cellules T CD4⁺ T_H1, T CD8⁺ et NK, et la liaison de leur CD40 au CD40 ligand (CD154) d'une autre cellule, comme les cellules T CD4⁺ T_H1 ou T_H2. Toutefois, les cellules T_H2 sont inefficaces pour activer les macrophages, étant donné qu'elles ne sécrètent pas d'IFN- γ et qu'en plus, elles sécrètent de l'IL-4, de l'IL-10 et du TGF- β , des cytokines qui inactivent les macrophages. Elles ne peuvent que préparer les macrophages à répondre à l'IFN- γ grâce à leur CD40 ligand (Janeway, Travers et al. 2001).

Les macrophages activés sont très efficaces dans l'élimination des micro-organismes intracellulaires, mais cette destruction ne peut avoir lieu sans lésions tissulaires. C'est pourquoi il est essentiel que l'activité des macrophages soit finement régulée, entre autres par la sécrétion contrôlée d'IFN- γ , libéré par les cellules T_H1. L'IL-12 est une des cytokines agissant comme agents effecteurs des macrophages activés dans les réponses de type cellulaire. Elle induit la différenciation des cellules T CD4⁺ naïves en cellules T CD4⁺ T_H1 effectrices (Janeway, Travers et al. 2001).

Les cytokines qui caractérisent le profil de sécrétion des cellules T_H1 par rapport au profil T_H2 sont le TNF- β , l'IL-2 et l'IFN- γ . Une étape cruciale dans l'établissement de ce profil est l'induction et l'expression soutenue du facteur de transcription T-bet, impliqué entre autres dans le remodelage des portions de chromatine exprimées dans les cellules T_H1, dont les allèles codant l'IFN- γ et l'IL-12R β 2 (Rengarajan, Szabo et al. 2000; Mullen, High et al. 2001).

5.2.2 Les lymphocytes T CD4⁺ T_H2

La production de cellules T CD4⁺ T_H2 mène à une immunité de type humoral. En effet, les cellules T CD4⁺ T_H2, appelées aussi lymphocytes T auxiliaires, ont pour principale fonction l'activation des lymphocytes B qui mène à leur différenciation en plasmocytes, des cellules productrices d'anticorps, dont les IgE. Cette classe d'anticorps stimule la croissance et la différenciation des mastocytes et des éosinophiles, des cellules immunitaires qui sont donc également activées par le biais des cellules T_H2.

La majorité des cytokines sécrétées par les cellules T_H2 sont soit impliquées dans la prolifération et la différenciation des lymphocytes B (IL-4, IL-5, IL-6), soit dans l'inactivation des macrophages (IL-4, IL-10, TGF-β). L'IL-4 est une des principales cytokines qui mène à la différenciation des cellules T_H2. Elle peut être sécrétée par les cellules T tueuses naturelles (NKT), les basophiles, les mastocytes et d'autres cellules T_H2 (Karulin, Hesse et al. 2002). Une étape cruciale dans l'établissement du profil T_H2 est l'induction et l'expression soutenue du facteur de transcription GATA3, impliqué entre autres dans le remodelage des portions de chromatine exprimées dans ces cellules (Rengarajan, Szabo et al. 2000).

5.3 L'organisation structurale et fonctionnelle du SI

Le SI est composé d'organes lymphoïdes centraux ou primaires, la moelle osseuse et le thymus, où sont générés les cellules immunitaires. Le SI comprend aussi des organes lymphoïdes périphériques ou secondaires, où se développent les réponses immunes, soit la rate, les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, comme les amygdales, les plaques de Peyer et l'appendice (Janeway, Travers et al. 2001).

Les lymphocytes B et T qui sortent de la moelle osseuse et du thymus sont différenciés, mais ils sont qualifiés de naïfs, car ils n'ont pas encore rencontré leur antigène. Ils retournent dans la circulation sanguine par les vaisseaux lymphatiques qui drainent les organes lymphoïdes (ou directement dans le sang dans le cas de la rate). Lorsqu'ils rencontrent leur antigène, ils restent dans l'organe lymphoïde où ils prolifèrent et se différencient en cellules effectrices. Les antigènes leur sont présentés par les macrophages et les CD qui les ont capturés au site infectieux (Janeway, Travers et al. 2001).

Les organes lymphoïdes fournissent une matrice dynamique qui permet l'établissement de zones distinctes, chacune définie par un microenvironnement caractéristique, souvent une zone B, une zone T et une zone riche en CD. Cette subdivision permet une interaction séquentielle efficace entre l'antigène et les différentes sous populations lymphoïdes et non-lymphoïdes. Toute perturbation dans l'architecture entraîne une réaction immune inappropriée (Pabst, Herbrand et al. 2004).

5.3.1 La rate

La rate est un organe situé derrière l'estomac composée majoritairement de pulpe rouge, dans laquelle sont disséminés des îlots de pulpe blanche (follicule). La pulpe rouge est un site de destruction des globules rouges, tandis que la pulpe blanche est composée de tissu lymphoïde, qui entoure les artérioles centrales qui pénètrent dans la rate. Les antigènes et les lymphocytes entrent dans la rate via la circulation sanguine. Les lymphocytes T se concentrent surtout autour de l'artériole centrale et ils sont entourés de zones riches en lymphocytes B, qui contiennent parfois un centre germinatif, i.e. site d'expansion clonale d'une cellule B qui a reconnu son antigène. Les follicules contenant des centres germinatifs ont également une zone appelée *corona* ou zone du manteau, composée de cellules B qui ne prennent pas part à la réponse immune. La zone marginale, dont la fonction est encore mal définie, est située à la frontière de la pulpe blanche et rouge et se compose de lymphocytes B qui ne retournent pas en circulation. La zone T, appelée aussi la gaine lymphoïde périartériolaire (PALS), contient également des CD qui présentent les antigènes aux lymphocytes (Janeway, Travers et al. 2001).

5.3.2 Le SI du tractus gastro-intestinal

L'épithélium de la muqueuse du tractus intestinal est constamment exposé à une multitude de micro-organismes pathogènes potentiels, face auxquels il doit fournir une barrière efficace. Pour ce faire, le tractus est tout d'abord recouvert d'un épithélium prismatique, dont les cellules, les entérocytes, sont reliées par des jonctions serrées, qui permettent le passage de l'eau et des ions, mais qui constitue une barrière mécanique pour les macromolécules (Bjarnason, MacPherson et al. 1995). De plus, des sécrétions locales d'IgA sécrétoires (IgA_s), de mucus et de glycocalyx recouvrent l'épithélium (Kett, Baklien et al. 1995; Maury, Nicoletti et al. 1995). Finalement, la présence d'enzymes hydrolases liées à la membrane intestinale rend cet environnement hautement hydrolytique (Semenza 1986). L'ensemble de ces moyens empêche le contact direct entre l'épithélium et les micro-organismes. Toutefois, il est également possible de transporter certains antigènes et micro-organismes à travers la muqueuse, afin qu'ils soient présentés au SI intestinal et qu'une réponse immune soit induite (Neutra, Pringault et al. 1996). Effectivement, les cellules M, les CD et les cellules épithéliales peuvent transporter des antigènes du lumen intestinal au tissu lymphoïde sous-jacent qui est dispersé dans un stroma lâche, afin de maintenir un bassin de lymphocytes diversifiés (Chehade et Mayer 2005).

Tout d'abord, les cellules M (pour *Microfold*) sont spécialisées dans le transport de macromolécules non solubles, à moins qu'elles possèdent un récepteur spécifique à un antigène soluble (Sicinski, Rowinski et al. 1990; Chehade et Mayer 2005). Elles sont surtout localisées au niveau de l'épithélium associé aux follicules (FAE) qui font partie des plaques de Peyer qui composent le GALT (Allan et Trier 1991; Hein 1999; Neutra, Mantis et al. 2001). En plus d'abriter les cellules M, les FAE se distinguent de l'épithélium de la muqueuse intestinale de par leur faible production de mucus, de défensines, de lysozyme et d'enzymes de la bordure en brosse (Owen et Bhalla 1983; Giannasca, Giannasca et al. 1994). Les cellules M diffèrent des entérocytes de par leur bordure en brosse faiblement organisée et formée de minuscules microvillosités irrégulières et par l'absence de glycocalyx. Elles internalisent les antigènes et les micro-organismes présents dans le lumen intestinal, soit par phagocytose, soit par endocytose au

niveau de leur membrane apicale, et les libèrent par exocytose dans le tissu lymphoïde sous-jacent, au niveau de leurs membranes basolatérales (Man, Prieto-Garcia et al. 2004). Des CD internalisent alors l'antigène et le présente aux lymphocytes B du follicule sous-jacent (Shreedhar, Kelsall et al. 2003). La surface basolatérale des cellules M est profondément invaginée. Cette "poche" abrite une grande variété de lymphocytes provenant du tissu lymphoïde sous-jacent, ce qui facilite le contact entre les antigènes et les cellules immunitaires spécialisées (Regoli, Bertelli et al. 1995; Neutra 1998).

Les cellules M ne sont pas seules pour effectuer le transport des macromolécules à travers la muqueuse intestinale. Il a en effet été démontré *in vitro* que les cellules dendritiques (CD) peuvent insérer leurs dendrites jusque dans le lumen, où ils internalisent directement les macromolécules, en ouvrant les jonctions serrées des cellules épithéliales (Rescigno, Rotta et al. 2001). Ce processus est possible parce que les CD, situées entre les plaques de Peyer ainsi que tout le long de l'épithélium intestinal dans la *lamina propria*, expriment les protéines qui forment les jonctions serrées, ce qui assure le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale (Kelsall et Strober 1996; Ruedl et Hubele 1997; Iwasaki et Kelsall 2000; Rescigno, Urbano et al. 2001). Toutefois, le manque d'évidence *in vivo* confirmant que les micro-organismes et les antigènes internalisés dans le dendrite sont ensuite présentés aux lymphocytes naïfs sous-jacents à l'épithélium laisse croire que ce sont réellement les cellules M qui jouent le rôle de transporteurs majeurs des composés bioactifs du lumen au tissu lymphoïde (Wang, Hone et al. 2003).

Finalement, les entérocytes internalisent également certains antigènes. Les protéines qui ont échappé à la protéolyse dans le lumen intestinal sont endocytées par les entérocytes et transportées dans des vésicules qui fusionnent avec des lysosomes pour former des phagolysosomes. Les molécules toujours intactes après leur passage dans le phagolysosome sont exocytées dans l'espace extracellulaire de la membrane intestinale (Walker et Isselbacher 1974).

5.3.2.1 Les plaques de Peyer

Les plaques de Peyer sont des structures lymphoïdes organisées distribuées le long de l'intestin grêle et du rectum, mais dont la concentration la plus élevée est retrouvée au niveau de l'iléum. Elles sont constituées d'un centre germinatif, composé de lymphocytes B qui sont entourés par un nombre inférieur de lymphocytes T. Suite à un signal approprié, comme la rencontre d'un antigène, les lymphocytes B migrent dans les ganglions lymphatiques mésentériques où ils subissent une maturation en précurseurs de plasmocytes. Ces précurseurs retournent dans la *lamina propria* intestinale où ils se différencient en plasmocytes matures qui sécrètent des IgA dimériques (Roux, McWilliams et al. 1981).

5.4 Les cytokines

Les cytokines sont des médiateurs chimiques de nature glycoprotéique, sécrétées en cascade par les cellules immunitaires (le plus souvent), suite à un stimulus. Elles peuvent modifier le comportement ou les propriétés de la cellule sécrétrice (autocrine) ou celui des cellules avoisinantes (paracrine). Elles agissent rapidement et à de très faibles concentrations sur leur cellule cible (Townsend et McKenzie 2000). La majorité des cytokines sécrétées par les lymphocytes portent le nom d'interleukines (IL).

5.4.1 L'IL-1

Il existe deux formes d'IL-1, soit l'IL- α et l'IL- β , qui sont toutes deux codées sur le chromosome 1 humain. Malgré le fait qu'elles n'ont que 26% d'homologie, elles exercent un rôle semblable, en agissant via le même récepteur (Furutani, Notake et al. 1986).

Les deux formes de l'IL-1 sont pro-inflammatoires et jouent un rôle central dans l'immunité innée, dû à leur large spectre d'action (Dinarello 2000). Elles sont produites, tout comme l'IL-18, sous la forme d'une molécule inactive de 33 kDa, qui doit être clivée par la caspase I, aussi appelée ICE (*IL-1 β -converting Enzyme*), avant d'être sécrétée sous leur forme active de 17 kDa par les monocytes et les macrophages activés (Giri, Lomedico et al. 1985; Miura, Zhu et al. 1993). La sécrétion d'IL-1 peut être induite par de nombreuses substances microbiennes, dont le LPS, mais aussi par des lésions tissulaires, des infections ou encore par la présence d'antigènes étrangers. Cette cytokine stimule les lymphocytes B et T, mais également plusieurs autres cellules qui n'appartiennent pas au SI, et elle initie la sécrétion de plusieurs cytokines, dont l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-6, et l'IL-8 (Werman, Werman-Venkert et al. 2004). C'est un pyrogène qui provoque la phase aiguë de la réaction inflammatoire en induisant la synthèse des protéines hépatiques de l'inflammation, la production d'ACTH et la fièvre (Dinarello 1996). Elle est considérée comme une cytokine précoce, car elle est habituellement sécrétée dans les six à seize heures suivant la stimulation cellulaire.

5.4.2 L'IL-4

Cette cytokine, aussi appelée facteur stimulant la croissance des cellules B (BSF1), stimule la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécrétant des IgE (Murphy, Ouyang et al. 2000). Elle augmente également le nombre de molécules du CMH II sur les lymphocytes B et les macrophages (Yokota, Otsuka et al. 1986). L'IL-4 stimule également l'activation et la prolifération des lymphocytes T, ainsi que leur différenciation en cellules T_H2, dans une action conjointe avec l'IL-10. Carvalho *et al.* ont aussi démontré que la réponse des cellules T CD8⁺ dépend de la présence d'IL-4 (Carvalho, Sano et al. 2002).

C'est une glycoprotéine composée de 129 acides aminés ayant un poids moléculaire de 18 kDa. Elle est sécrétée par les lymphocytes T CD4⁺ T_H2 de façon précoce, c'est-à-dire peu de temps après la stimulation du TCR des cellules T naïves, la première étape qui mène à la différenciation en cellule effectrice T_H1 ou T_H2 (Fields, Kim et al. 2002). L'IL-4 est également sécrétée par d'autres types cellulaires, comme les basophiles, les mastocytes et les éosinophiles (Kelly-Welch, Hanson et al. 2005).

L'IL-4 peut être considérée comme une cytokine anti-inflammatoire, car elle inhibe la synthèse d'IL-1, d'IL-6, du TNF- α et de l'IFN- γ , toutes des cytokines pro-inflammatoires (Finkelman et Urban 2001). Son expression peut être inhibée par l'IFN- γ , une cytokine qui induit entre autres l'expression de SOCS1, qui empêche le transducteur de signal et activateur de la transcription STAT6 d'effectuer sa fonction, soit l'induction de la transcription d'IL-4 (Dickensheets, Venkataraman et al. 1999). Le récepteur de l'IL-4 est composé d'une chaîne α qui permet une liaison de haute affinité avec l'IL-4 et d'une chaîne γ qui interagit avec le complexe IL-4 / IL-4R α (Nelms, Huang et al. 1998). L'hétérodimérisation du récepteur entraîne en effet l'activation de tyrosines kinases de la famille Janus (Jak1 et Jak3), qui mène à l'activation de STAT6, le facteur de transcription qui se lie au promoteur de l'IL-4 pour en stimuler l'expression (Kelly-Welch, Hanson et al. 2003). Dans les cellules T_H2, l'IL-4 active également STAT6 et agit ainsi comme rétro-activateur de sa propre transcription (Wurster, Tanaka et al. 2000).

L'IL-4 et l'IFN- γ sont deux cytokines antagonistes, car elles sont respectivement sécrétées par deux types cellulaires qui ont des actions opposées, soit les cellules T_{H2} et T_{H1}. Au niveau moléculaire, cela s'explique par le fait que malgré qu'elles soient situées sur des chromosomes distincts (11 et 10 chez la souris), leurs expressions sont intimement reliées. En effet, le promoteur de l'IFN- γ interagit avec la région qui contrôle l'expression des locus (LCR) des gènes codant pour l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13, des cytokines qui sont toutes exprimées par les cellules T_{H2}. Ces trois dernières cytokines montrent un exemple d'interaction intrachromosomique, et ce malgré le fait que leurs gènes soient étalés sur plus de 120 kb, car ils sont juxtaposés grâce à la conformation de la chromatine (Spilianakis, Lalioti et al. 2005). L'IL-4 peut même contrebalancer l'influence de l'IL-12 et empêcher la différenciation des cellules T_{H1} productrices d'IFN- γ (Nishikomori, Ehrhardt et al. 2000).

5.4.3 L'IL-10

L'existence d'une cytokine inhibitrice, appelé l'IL-10 a été décrite en 1991 par Vieira *et al.* et localisée l'année suivante au locus 1q31 et 1q32 du chromosome humain 1 (Kim, Brannan *et al.* 1992). C'est un homodimère de 35 kDa, dont les sous-unités ne sont pas liées par un pont disulfure. Elle commence habituellement à être sécrétée dans les seize à vingt-quatre heures qui suivent la stimulation cellulaire. Sa liaison avec son récepteur stimule, comme plusieurs des autres cytokines décrites dans ce mémoire la voie de signalisation intracellulaire Jak/STAT (Wehinger, Gouilleux *et al.* 1996)

Cette cytokine est majoritairement produite par plusieurs cellules dont, les lymphocytes T CD4⁺ T_H2, les lymphocytes B, les mastocytes, les éosinophiles, les monocytes, les macrophages, les kératinocytes et plusieurs cellules tumorales (Sher, Fiorentino *et al.* 1991; Howard, O'Garra *et al.* 1992; Eskdale, McNicholl *et al.* 1998).

L'IL-10 peut exercer plusieurs actions diversifiées, dépendamment du microenvironnement et du type cellulaire sur lequel elle agit (Lalani, Bhol *et al.* 1997). L'IL-10 joue un rôle majeur dans la suppression de l'inflammation. Elle empêche la prolifération des lymphocytes T en inhibant la production d'IL-2, et l'activation des CPA, en diminuant l'expression des molécules du CMH-II et les molécules co-stimulatrices à leur surface (de Waal Malefyt, Yssel *et al.* 1993). De plus, l'IL-10 empêche l'expression de l'oxyde nitrique synthase, une enzyme responsable de la production d'oxyde nitrique (NO), un médiateur de l'inflammation (Liew 1993). L'IL-10 inhibe également à la flambée oxydative des macrophages et la production de cytokines inflammatoires, dont le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6 et l'IFN- γ (Bogdan, Vodovotz *et al.* 1991; Meng, Sawamura *et al.* 1998). Finalement, comme l'IL-10 est sécrété par les cellules T_H2, il est logique qu'elle nuise au développement des cellules T_H1. Effectivement, comme mentionnée précédemment, elle nuit à l'activation des CPA, et empêche donc la sécrétion des cytokines activatrices de la voie de différenciation T_H1, tel l'IL-12 et l'IL-18.

5.4.4 L'IL-12

L'IL-12, aussi appelée le facteur stimulant les cellules NK (NKSF), est une cytokine clé du SI inné. Elle peut être sécrétée suite à une exposition à des produits microbiens comme le LPS, dans les six à seize heures suivant l'exposition. Elle est surtout sécrétée par les CPA activées, soit les macrophages, les CD et les lymphocytes B, suite à leur stimulation, en présence d'IFN- γ ou d'IL-1, par des produits microbiens ou une interaction CD40-CD40 ligand avec une cellule T (Wolf, Temple et al. 1991; Gately, Renzetti et al. 1998). Ferlazzo, Pack et al. (2004) ont montré que l'IL-12, sécrétée par les CD activées dans les ganglions lymphatiques, stimulait la production d'IFN- γ par les cellules NK (Ferlazzo, Pack et al. 2004). D'autre part, elle induit la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en cellules effectrices T_{H1} (Pesu, Muul et al. 2006). L'IL-12, comme plusieurs autres cytokines, initie donc une boucle de rétro activation, car en stimulant la production d'IFN- γ par les cellules NK et T_{H1}, elle active par le biais de cette cytokine les cellules même qui l'ont synthétisé, soit les macrophages.

L'IL-12 fait le pont entre la résistance innée et l'immunité adaptative. Effectivement, elle initie l'immunité cellulaire en stimulant la production d'IFN- γ par les cellules NK, T CD4⁺ T_{H1} et T CD8⁺, ce qui favorise une réponse T_{H1}, tout en inhibant la réponse T_{H2}, associée à l'immunité adaptative. En effet, la production d'IFN- γ , stimulée par l'IL-12, inhibe la sécrétion d'IL-4, ce qui diminue la prolifération des cellules T_{H2} et l'expression des molécules du CMH-II chez les lymphocytes B, deux processus stimulés par l'IL-4. De plus, elle favorise la prolifération et l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et des lymphocytes tueurs activés (LAK), associés au SI inné (Wang, Li et al. 1998). L'IL-12 est donc généralement une cytokine pro-inflammatoire.

L'IL-12 possède une activité biologique très puissante; elle peut exercer son action sur les cellules T et les cellules NK à des concentrations inférieures aux picomoles, grâce à son récepteur de haute affinité composé de 2 sous-unités, soit l'IL-12R β 1 et l'IL-12R β 2 (Wolf, Temple et al. 1991). L'IL-12R β 1 est présent autant sur les cellules T_{H1} que T_{H2}, tandis que l'IL-12R β 2 est présente seulement à la surface des cellules T_{H1}. Cette expression étroitement contrôlée de la sous-unité IL-12R β 2 est importante, étant donnée que c'est la liaison de l'IL-12 avec cette sous-unité qui induit la transduction du signal intracellulaire qui mène à l'activation du facteur de transcription STAT4. Ce dernier est impliqué dans l'expression de la majorité des gènes transcrits dans les cellules T et NK en présence d'IL-12 (Lawless, Zhang et al. 2000; Wu, Wang et al. 2000).

Toutefois, l'IL-12 semble nécessiter la présence de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), responsable de la production de NO, pour stimuler la cytotoxicité et la production d'IFN- γ par les cellules NK. De plus, iNOS est requis pour l'expression de l'IL-12, car sans elle, STAT4 ne peut être activé, et ce facteur de transcription est essentiel à l'expression de l'IL-12 (Diefenbach, Schindler et al. 1999). Un autre régulateur, mais cette fois négatif, qui est important dans la sécrétion d'IL-12 est le facteur de signalisation intracellulaire MAP3K8 (protéine MAP kinase kinase kinase 8). Elle inhibe la production d'IL-12 et nuit donc à l'établissement d'une réponse de type T_{H1} (Sugimoto, Ohata et al. 2004).

L'IL-12 est un hétérodimère de 70 kDa composé de deux sous-unités protéiques reliées par un pont disulfure, soit p35 (35 kDa) et p40 (40 kDa), aussi appelées IL-12A et IL-12B, qui sont respectivement localisées aux locus 3p12-q13.2 et 5q31-q33 du chromosome 3 et 5 humain. La transcription de ces deux sous-unités est induite de façon coordonnée, suite à l'activation des cellules productrices, car elles sont toutes deux nécessaires afin que l'IL-12 soit biologiquement active (Wolf, Temple et al. 1991). Toutefois, la sous-unité p35, produite en quantité beaucoup moins élevée que p40, ne peut être sécrétée que sous la forme p70, soit en association avec p40. La sous-unité p40 peut au contraire être sécrétée sous forme de monomère, d'homodimère ou en association avec la sous-unité p19 (IL-23A) pour former l'IL-23, une cytokine qui médie les stades tardifs de l'inflammation et qui semble impliquée dans l'inflammation chronique (Gately, Renzetti et al. 1998; Cua, Sherlock et al. 2003).

5.4.5 L'IL-18

L'IL-18 est synthétisé sous la forme d'un précurseur inactif qui requiert un clivage par la caspase-1 pour être devenir actif, tout comme l'IL-1 (Sugawara, Uehara et al. 2001). La liaison de l'IL-18 à son récepteur, qui est composé de 2 sous-unités, soit IL-18R α et IL-18R β , mène à l'activation de NF κ B et de la p38 MAPK, deux molécules impliquées dans la signalisation intracellulaire, qui sont également activées par l'IL-1 (Yang, Zhu et al. 2001; Sims 2002).

L'IL-18 est une cytokine pléiotropique décrite à l'origine comme un facteur dérivé des cellules Kupffer capable d'induire la production d'IFN- γ par les cellules NK et T activées (Okamura, Tsutsi et al. 1995). On sait aujourd'hui que cette cytokine peut aussi être sécrétée par les macrophages et les cellules dendritiques. Elle exerce son activité pro-inflammatoire d'une part en stimulant la sécrétion de TNF- α , une cytokine qui contribue à l'immunité innée, et d'autre part en favorisant la différenciation des cellules T_{H1}, en collaboration avec l'IL-12 (McInnes, Gracie et al. 2000). L'IL-12 et l'IL-18 agissent en synergie en stimulant toutes deux l'expression de la chaîne β du récepteur de l'autre cytokine. La chaîne α du récepteur de l'IL-12 et de l'IL-18 sont toutes deux exprimées de façon constitutive sur les cellules T, mais l'expression de la chaîne β est respectivement induite par l'IL-18 et l'IL-12 (Chang, Segal et al. 2000; Smeltz, Chen et al. 2001). De plus, ces deux cytokines activent des voies de signalisation qui se complètent, car elles mènent toutes deux à la transcription de l'IFN- γ . Conséquemment, l'IL-12 et l'IL-18 ne sont pas seulement nécessaires au développement des cellules T_{H1} suite à l'engagement du TCR par un antigène. Elles permettent également la production d'IFN- γ par l'activation d'une voie TCR-indépendante, qui stimule la différenciation des cellules T_{H1}, et donc la production d'IFN- γ , lors d'une réponse immune non-spécifique à un antigène particulier (Yang, Zhu et al. 2001).

La sécrétion de l'IL-18 active peut être stimulée entre autres par le LPS et d'autres cytokines, comme le TNF- α et l'IL-1 β , mais l'expression de cette cytokine est constitutive. Elle est habituellement sécrétée dans les 6 à 16 heures suivant la stimulation cellulaire (Loher, Bauer et al. 2004), (Stoll, Muller et al. 1997).

5.4.6 L'IFN- γ

Les interférons sont des cytokines antivirales, qui ont également une activité anti-tumorale et antimicrobienne. Ils sont pléiotropes, i.e. qu'ils exercent des actions diversifiées, et ce non seulement sur les cellules du SI, mais également sur plusieurs autres types cellulaires.

L'IFN- γ est un puissant activateur des macrophages; il amplifie leur efficacité en augmentant le nombre de molécules de CMH-II à leur surface, en plus d'accentuer leur potentiel d'activation des lymphocytes T et leur pouvoir microbicide. L'INF- γ initie donc une boucle de rétroaction positive sur l'activation des lymphocytes T. En effet, les lymphocytes T activés sécrètent l'INF- γ , qui augmente le potentiel d'activation de ces lymphocytes par les CPA, ce qui accentue le degré d'activation des lymphocytes T et donc leur sécrétion d'INF- γ , ce qui mène au développement d'une réponse T_H1 , des cellules différenciées effectrices spécialisées dans la production d'IFN- γ (Tamir, Jordan et al. 2005). De plus, l'IFN- γ stimule la production d'IL-12, une des cytokines qui stimule sa sécrétion, et maintient l'expression de son récepteur (IL-12R β 2) chez les cellules T naïves (Poncet, Arock et al. 1999).

L'IL-12 et l'IL-18 agissent de façon synergique pour induire la synthèse de l'IFN- γ , par les lymphocytes T $CD4^+$ T_H1 , les lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques effecteurs et les cellules NK activées. Elles rendent toutes deux les cellules plus susceptibles à l'autre cytokine en augmentant l'expression de la chaîne β du récepteur de celle-ci. De plus, elles régulent toutes deux positivement le promoteur du gène de l'IFN- γ et, augmente donc la transcription de cette cytokine, dont le gène humain est situé au locus 12q24.1 et son homologue murin sur le chromosome 10 (Kohno, Kataoka et al. 1997; Diefenbach, Schindler et al. 1999; Fantuzzi, Reed et al. 1999). La sécrétion de l'IFN- γ débute habituellement dans les 24 heures qui suivent la stimulation cellulaire.

L'acétylation des histones autour desquelles l'ADN est enroulé est une étape préalable à la transcription d'un gène. Fields, Kim et al. (2002) ont démontré que les histones H3 et H4 associées au locus de l'IFN- γ ne sont pas acétylées dans les lymphocytes T naïfs, mais qu'elles le deviennent progressivement suite à la stimulation du TCR. C'est le facteur de transcription STAT4 qui est responsable du maintien de cette acétylation (Fields, Kim et al. 2002). STAT4 est un des facteurs de transcription qui module l'expression de l'IFN- γ , mais il y a d'autres, selon le type cellulaire dans lequel cette cytokine est exprimée. Par exemple, Tbet, un membre de la famille des boîtes-T, est un facteur de transcription requis pour l'expression d'IFN- γ dans les cellules NK et pour la différenciation des cellules T CD4⁺ T_H1, mais pas pour les cellules T CD8⁺ (Szabo, Sullivan et al. 2002).

6. Objectifs de travail

L'atteinte de deux objectifs principaux est visée par les travaux présentés dans ce mémoire. Premièrement, la production et la caractérisation de l'EPS produit en grande quantité par la souche *Lb. kefiranofaciens* INIX, isolée de grains de kéfir. Deuxièmement, l'évaluation du potentiel immunomodulateur de cet EPS, par la stimulation *in vitro* d'une lignée cellulaire de macrophages et par le gavage de souris avec l'EPS, suivi de la stimulation *ex vivo* des splénocytes isolés de ces mêmes souris.

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODE

1. Production et caractérisation physique et chimique de l'exopolysaccharide

1.1 Production

1.1.1 Souche bactérienne

L'exopolysaccharide a été produit par la souche *Lactobacillus kefiranofaciens* INIX, qui a été isolée à partir de grains de kéfir, par Technologie Biolactis Inc.

1.1.2 Production de biomasse

La production de biomasse débute par la décongélation à la température de la pièce (TP) d'un ferment congelé d'INIX. Il est important de vortexer le ferment décongelé, afin de défaire les billes d'alginate. Un milieu de culture approprié à la croissance des bactéries lactiques, le RCW (Rogosa Cheese Whey de VWR), est ensuite inoculé avec le ferment, à raison de 1 ml de ferment par 500 ml RCW. Le tout est incubé pendant 24 heures à 30°C, sans agitation. Cette préculture est ensuite diluée 1/10 dans du RCW (50 ml préculture + 450 ml RCW), et ce bouillon est incubé pendant 48 heures à 30°C, toujours sans agitation. Les cultures sont effectuées dans des volumes de 500 ml, car des expériences antérieures ont démontré que la croissance d'INIX était inhibée lors de productions à plus grande échelle.

1.1.3 Purification et conservation de l'EPS

Le protocole suivant a été utilisé pour les lots ABE1 et ABE3, alors que le lot ABE2 a été purifié selon un protocole alternatif, décrit plus loin dans cette section.

Après l'incubation, les bactéries sont éliminées par une centrifugation à 10 000 x g pendant 20 minutes à TP. Le surnageant est ensuite transféré dans une bouteille stérilisée contenant un volume équivalent d'éthanol 95% volume/volume (v/v) froid. Le tout est mélangé par inversion et entreposé à -20°C toute la nuit afin de favoriser la précipitation. Le lendemain, une centrifugation à 10 000 x g pendant 20 minutes à 4°C permet de récolter le précipité, composé d'EPS et de protéines. Pour séparer l'exopolysaccharide des protéines, le culot est dissous dans un volume minimal d'eau distillée à environ 70°C avec agitation, pendant 2-3 heures. Ensuite, une centrifugation à 10 000 x g pendant 20 minutes à 30°C permet d'éliminer la majeure partie des protéines, car suite à leur dénaturation par la chaleur, elles ont tendance à précipiter et se retrouvent donc dans le culot, alors que l'EPS dissous reste dans le surnageant. Afin d'éliminer les protéines résiduelles du surnageant, les étapes de précipitation dans un volume équivalent d'éthanol 95% (v/v) froid, de centrifugation et de dissolution dans l'eau distillée sont répétées. Le surnageant final contient toutefois des particules en suspension, dont la densité trop petite ne permet pas d'être culotée à la vitesse de centrifugation utilisée. Elles ont donc été éliminées par une filtration sous pression, avec un filtre de 0,45 µm et un préfiltre de porosité 0.8-8.0 µm (Millipore AP20). Ensuite, l'EPS a été dialysé contre 20 l d'eau distillée, dans une membrane de nitrocellulose 3,5 kDa (Pierce), à 4°C avec agitation pendant 48 heures. L'eau a été changée après 24 heures. Suite à la dialyse, l'EPS a été congelé pour être lyophilisé sous vide. Il est finalement conservé sous vide dans un dessiccateur, afin d'éviter sa réhydratation.

Un protocole alternatif a été testé pour le lot ABE2. Suite à l'élimination du culot bactérien, le surnageant a été bouilli pendant 15 minutes, afin d'inactiver les enzymes, potentiellement présentes dans le surnageant, qui auraient pu dégrader l'EPS. La température du surnageant est subséquemment redescendue à 37°C par une incubation à 4°C. Ensuite, le surnageant est digéré avec de la pronase (Sigma), à raison de 50 µg par litre de milieu de culture initial, pendant 1 heure à 37°C sous agitation. Puis, le

sumageant a été divisé en deux (lots ABE2a et ABE2b) et 5 ml de TCA 80% (p/v) ont été ajoutés par litre de sumageant, afin de précipiter les protéines. Ces deux lots ont ensuite été traités comme les lots ABE1 et ABE3, i.e. précipitation à l'éthanol 95% (v/v), centrifugation, dissolution dans l'eau à 70°C, etc.

1.2 Caractérisation physique

1.2.1 Fractionnement par poids moléculaire

Environ la moitié du lot ABE1 a été dissous dans un volume minimal d'eau distillée, pour être fractionné par poids moléculaire, à l'aide de membranes de nitrocellulose (Pall Filtron) de différentes porosités (10, 50, 100, 500 kDa) et d'un système de concentration Amicon, soumis à une pression de 50-70 psi. Le fractionnement de l'EPS débute par la membrane de porosité élevée (500 kDa) et se termine avec la membrane de porosité peu élevée (10 kDa). Tous les rétentats sont conservés pour être lyophilisés et les perméats utilisés pour être filtrés avec une membrane de porosité moins élevée. Les membranes sont d'abord rincées avec 100 ml d'eau distillée. La solution d'EPS est ensuite ajoutée. Toutes les filtrations ont lieu à la température de la pièce.

1.3 Caractérisation chimique

Suite à la purification de l'EPS, des analyses chimiques et physiques ont été effectuées afin d'évaluer sa pureté, son poids moléculaire, la nature et la proportion relative de ses sous-unités monosaccharidiques ainsi que les liens qui les unissent, et finalement la proportion de ses atomes.

1.3.1 Dosage des sucres dans l'EPS par la méthode de Dubois

Le test de Dubois permet de déterminer la quantité d'équivalent de glucose présents dans l'EPS. Pour les 3 lots, une solution de 8 ml d'EPS 50 mg/l et 75 mg/l dissous dans l'eau distillée a été préparée. Ensuite, 2 ml d'EPS dissous ont été déposés dans 3 Erlenmeyers de 125 ml. Il est important d'inclure aussi un blanc, i.e. 2 ml d'eau distillée (au lieu de 2 ml d'EPS) et une courbe standard de solutions de glucose diluées dans l'eau distillée (25, 50, 75 et 100 mg/l). Sous la hotte chimique, 5 ml d'une solution de phénol 5% (p/v) dilué dans l'eau sont ajoutés et le tout est agité 30 secondes à 100 rpm. Pendant l'agitation, 10 ml d'acide sulfurique 36 M sont ajoutés. Il faut laisser le tout à TP pour un minimum de 30 minutes, afin que la réaction puisse avoir lieu. Chaque solution est transférée dans une cuvette en plastique à spectrophotomètre pour être lue à 488 nm. La courbe standard permet de déduire la quantité d'équivalents de glucose présents dans les deux solutions initiales d'EPS.

1.3.2 Dosage des protéines dans l'EPS par la méthode de Lowry

L'EPS lyophilisé est dissous dans l'eau distillée à une concentration finale de 1% (p/v) et 3 dilutions sont faites à partir de cette solution. Puis, 500 μ l d'EPS est déposé dans une éprouvette en verre. Dans l'ordre, 500 μ l de la solution 1 et 200 μ l de la solution 2 sont ensuite ajoutés dans chaque éprouvette et le tout est mélangé au vortex. Après une incubation de 15 minutes à TP, 375 μ l de la solution 3 sont ajoutés et le tout est encore incubé 15 minutes à TP. La solution est finalement transférée dans une cuvette en plastique à spectrophotomètre pour être lue à 700 nm. Toutes les dilutions sont dosées en triplicata et une courbe standard de BSA (albumine sérique bovine) de 0 à 120 μ g/ml, également incluse dans le test, permet de déterminer la quantité de protéines résiduelles dans l'EPS. Toutes les solutions utilisées pour ce test sont décrites à l'annexe 2.

1.3.3 Analyse élémentaire

L'EPS du lot ABE1 a également été soumis à une analyse élémentaire du carbone, de l'hydrogène, de l'azote et du soufre, effectuée par le service d'analyse élémentaire de l'Université de Montréal. Environ 2 mg d'EPS est déposé dans une cupule d'étain, qui est alors placée dans un auto-échantillonneur purgé avec un courant d'hélium continu. L'échantillon est introduit dans le réacteur de combustion, un tube de quartz maintenu à 1021°C, où le courant d'hélium est temporairement enrichi avec de l'oxygène pur. L'EPS et l'étain fondent et, sous cette atmosphère enrichie en oxygène, l'étain provoque une violente réaction de combustion. Toutes les substances organiques et inorganiques sont alors converties en produits de combustion (CO_2 , H_2O , N_2 , SO_2). Ces gaz sont transportés par le gaz porteur dans la colonne chromatographique (Fisons EA1108-CHNS). Ils sont séparés et détectés par un détecteur de conductivité thermique, qui donne un signal correspondant à la concentration de chacun des composants.

1.3.4 HPLC

Une analyse des sous-unités monosaccharidiques composant l'EPS a été effectuée par HPLC sur les trois lots produits. Il a donc d'abord fallu hydrolyser l'EPS, afin de séparer ses monosaccharides les uns des autres. Pour ce faire, une solution d'EPS 0,1% (i.e. 1 mg/ml) a été hydrolysée dans une solution de HCl à une concentration finale de 1N pendant 4 heures à 100°C. Il est important de souligner que toutes les solutions utilisées pour l'analyse HPLC sont faites avec de l'eau déionisée. La solution d'EPS est ensuite neutralisée avec du NaOH 1 N, filtrée sur un filtre 0,22 µm et diluée 1/10 dans l'eau déionisée, avant d'être analysée par HPLC. Pour permettre le dosage des monosaccharides de l'EPS, une courbe standard est préparée. Elle s'étend de 25-300 µM et chaque standard contient les 3 résidus susceptibles de composer l'EPS, soit le D (+) glucose, le D (+) galactose et le D (+) mannose. Le D (-) arabinose est utilisé comme contrôle interne dans toutes les solutions, à raison de 100 µM. Les analyses sont effectuées par un système HPLC Dionex DX-500 sur une colonne CarboPack^{MC} PA-10 (4 X 250 mm) équilibrée dans une solution de 18 mM de NaOH, avec un débit linéaire de 119,4 cm/h. Un système de détection à ampérométrie pulsée couplé à un ordinateur a été utilisé. Tous les échantillons sont injectés en boucle, à un débit de 119,4 cm/h, à raison de 100 µl par échantillon. Le programme d'élution est présenté au Tableau 1.

Tableau 1 : Programme d'élution permettant la séparation des résidus monosaccharidiques qui composent l'EPS d'INIX

Temps (minutes)	% Eau déionisée	% NaOH 200 mM
0	91	9
15	91	9
25	0	100
40	0	100
40.5	91	9
55	91	9

1.3.5 H-RMN

L'EPS du lot ABE1 a été soumis à une analyse des liens entre les résidus monosaccharidiques par per-méthylation, suivi d'une hydrolyse, d'une acétylation et d'une analyse en spectrométrie de masse par chromatographie gazeuse (GC-MS). Cette analyse a été effectuée par l'équipe du Dr Michel Gilbert Ph.D., dans une collaboration avec le Conseil national de recherches Canada - Institut des sciences biologiques (CNRC-ISB) à Ottawa.

2. Évaluation du potentiel immunomodulateur *in vitro*

2.1 RAW 264,7

2.1.1 Origine et mise en culture

La lignée de macrophages murins utilisée est issue d'une tumeur isolée d'une souris BALB/C mâle ayant la leucémie Abelson (ATCC : RAW 264,7). Cette lignée cellulaire adhérente est maintenue à 37°C dans une atmosphère saturée en eau et contenant 5% de CO₂, dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media* de Gibco Invitrogen), complété à 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (FBS) (Multicell) et 1% (v/v) pénicilline/streptomycine (Gibco Invitrogen). Afin de maintenir les cellules en culture dans le temps, elles sont trypsinisées à l'aide de trypsine-EDTA (Gibco Invitrogen) pendant 5 minutes, puis diluées 1/10 tous les 3-4 jours, selon leur confluence.

2.1.2 Immunostimulation

Les tests d'immunostimulation ont été effectués pendant 24 heures, sur des cellules à 60% de confluence, dans des flacons T-25, contenant 7 ml de milieu. L'immunostimulation débute lorsqu'une solution stérile de LPS ou d'EPS lot ABE1 est ajoutée aux RAW 264,7, à une concentration finale de 0,1 et 1 µg/ml de LPS et de 1 et 10 µg/ml d'EPS. Le LPS sert ici de contrôle positif pour la stimulation de la transcription de l'IL-1. Les cellules qui ne reçoivent aucun stimulant servent de contrôle négatif dans cette expérience.

2.1.3 Extraction d'ARN total

Il faut toujours mettre des gants et travailler avec du matériel certifié sans RNase lors des manipulations avec l'ARN. C'est pourquoi l'eau DEPC (annexe 3) est utilisée au lieu de l'eau distillée, car le DEPC inhibe l'action de ces enzymes. Lors de toutes les manipulations, l'ARN est toujours conservé sur glace ou dénaturé à 65°C, mais jamais à TP, car les RNases sont très actives à cette température.

Après 24 heures de stimulation, le milieu de culture est enlevé et les cellules sont lysées en ajoutant directement 1 ml de TRIzol (Invitrogen Life Technologies) dans le flacon. La solution est transférée dans un microtube de 1,5 ml contenant 200 µl de chloroforme. Le tout est mélangé vigoureusement, incubé 2-3 minutes à TP et centrifugé à 12 000 x g pendant 15 minutes à 4°C. La couche incolore supérieure est transférée dans un autre microtube, en prenant bien soin de ne pas prélever l'interface, ni la couche inférieure, et l'ARN est précipité par l'ajout de 500 µl d'alcool isopropylique. Après 10 minutes d'incubation à TP, une centrifugation à 12 000 x g pendant 10 minutes à 4°C permet de culotter l'ARN, qui est ensuite lavé avec 1 ml d'éthanol 75% (v/v) (dilué dans l'eau DEPC) et centrifugé à 7500 x g pendant 5 minutes à 4°C. Après avoir enlevé l'éthanol et laissé sécher l'ARN à l'air ambiant, 35 µl d'eau DEPC sont ajoutés pour dissoudre l'ARN, qui sera finalement entreposé à -70°C. Pour vérifier la qualité et la quantité de l'ARN extrait, 4 µl sont dilués dans 996 µl d'eau DEPC et lu dans une cuvette en quartz au spectrophotomètre à 260 nm et à 280 nm. Un ratio 260 nm/ 280 nm supérieur à 1,6 correspond à une qualité d'ARN satisfaisante. Le dosage est possible grâce à la formule suivante : $DO_{260} \times 250$ (facteur de dilution) $\times 40$ µg/ml.

2.1.4 Transcription inverse

L'ARN (1 µg dans 10 µl) est transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par l'ajout, dans un 1^{er} temps, de 6 µl de la solution 1 et d'une incubation de 5 minutes à 70°C, suivi dans un 2^e temps de l'ajout de 4 µl de la solution 2 et d'une incubation d'une heure à 42°C. La transcriptase inverse du virus Moloney-Murine Leukemia Virus (M-MuLV de NEB) est ensuite inactivée par une incubation de 5 minutes à 95°C. L'ADNc est dilué dans un volume final de 50 µl, en ajoutant 30 µl d'eau DEPC. Les solutions 1 et 2 sont détaillées dans l'annexe 4.

2.1.5 PCR sur l'IL-1 (réaction de polymérisation en chaîne)

Une paire d'amorces (détaillées dans l'annexe 8) spécifiques à l'IL-1 murine permet l'amplification exclusive de ce fragment d'ADNc par le programme de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) présentée dans le tableau 2. À 12,5 µl de solution 1 (annexe 5), 1,25 µl d'ADNc est ajouté et les tubes sont déposés dans l'appareil à PCR. Pendant l'étape 1 du programme, 11,25 µl de la solution 2 (annexe 5) sont ajoutés à chaque tube.

Tableau 2 : Programme utilisé pour amplifier l'IL-1 par PCR

No.	Description	Température (°C)	Temps (secondes)	
1	Démarrage à chaud	95	300	
2	Dénaturation	94	30	Les étapes 2-4 sont répétées 29 fois
3	Hybridation	65 (T _m)	45	
4	Élongation	72	45	
5	Élongation	72	420	
6	Pause	4	indéfini	

2.1.6 Gel d'agarose 0.9% (p/v)

Suite à la réaction de PCR, 1,25 μ l de tampon de chargement 6X est ajouté à 7 μ l d'ADN amplifié et le tout est déposé dans un gel d'agarose 0,9% (p/v), qui est soumis à 100V pendant un peu plus d'une heure. Un marqueur de poids moléculaire (5 μ l kb ladder +) est également déposé dans le gel, pour permettre l'estimation du poids moléculaire des fragments amplifiés par la PCR. Les détails concernant la préparation du gel et du tampon de chargement sont décrits dans l'annexe 6. Une fois la migration terminée, le gel coloré au bromure d'éthidium est lu sous UV à l'aide d'un appareil Gel Doc 1000 (Bio-Rad).

2.2 Splénocytes

2.2.1 Isolement des cellules

La rate de souris C57Bl/6 est prélevée de façon stérile et déposée dans 1 ml de RPMI 1640 (Gibco Invitrogen) supplémenté à 10% (v/v) de sérum de fœtus bovin (FBS de Multicell) et 1% (v/v) de pénicilline/streptomycine (Gibco Invitrogen). Sous le laminaire de la salle de culture, les splénocytes sont délicatement extraits de l'enveloppe de la rate en appuyant le piston d'une seringue de 5 ml sur la rate, déposée avec le RPMI dans un tamis cellulaire, lui-même déposé dans un pétri. Environ 10 ml de RPMI sont utilisés pour rincer le tout et les cellules en suspension sont ensuite transférées dans un Falcon de 50 ml et centrifugées à 1000 x g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est enlevé, les cellules sont re suspendues par tapotements et les globules rouges sont lysés à TP pendant 5 minutes dans 5 ml d'ACK (annexe 7). La réaction est arrêtée en ajoutant 30 ml de RPMI et une centrifugation à 1000 x g pendant 5 minutes à 4°C permet de culoter les splénocytes et d'enlever le surnageant contenant l'ACK. Deux autres lavages sont effectués pour enlever les traces d'ACK, à raison de 30 ml de RPMI chacun. Après le dernier lavage, les splénocytes sont resuspendus dans 10 ml de RPMI et la concentration cellulaire est déterminée en transférant 100 µl de cellules dans un tube de polypropylène contenant 400 µl de PBS, auquel 10 µl de bromure d'éthidium (BrEt) 100x sont ajoutés. Après 10 minutes à TP, le nombre de cellules vivantes est compté par cytométrie en flux (Coulter), un appareil qui différencie les cellules selon leur granulométrie et leur taille. Le BrEt est un colorant qui émet un fluorochrome reconnu par le cytomètre. Il entre dans les cellules perméabilisées et il permet donc de différencier les cellules mortes des cellules vivantes.

2.2.2 Immunostimulation des cellules en culture

La concentration des cellules est ajustée à 3×10^6 cellules vivantes/ml de RPMI supplémenté et la suspension cellulaire est distribuée à raison de 6 ml/puits d'une plaque de 6 puits. Le RPMI est supplémenté à une concentration finale de 10% FBS (v/v), 1% (v/v) pénicilline/streptomycine, d'acides-aminés 1x (Gibco Invitrogen) et de β -mercaptoéthanol 50 μ M. Ensuite, 50 μ l de produits sont ajoutés pour stimuler les splénocytes, à une concentration finale de 0,1 μ g/ml LPS, 50 μ g/ml EPS ou 5 μ g/ml concanavale A (ConA) de Sigma dilué dans du PBS. Le LPS et la ConA sont utilisés à titre de contrôles positifs de stimulation cellulaire. Il y a également certains puits qui ne sont stimulés avec aucun produit, afin d'avoir un contrôle négatif de stimulation. Les cellules sont incubées pendant 24 heures à 37°C, dans une atmosphère saturée en eau et contenant 5% de CO₂.

2.2.3 Extraction d'ARN total, RT-PCR pour l'IL-12 et gel d'agarose 0,9% (p/v)

Les splénocytes en culture sont transférés dans un Falcon de 15 ml et centrifugés à 1000 x g pendant 5 minutes à TP. Le surnageant est enlevé et les cellules sont lysées par l'ajout de TRIzol, selon le protocole décrit pour l'extraction d'ARN des cellules RAW 264,7. Les protocoles appliqués lors de la transcription inverse, de la réaction de PCR et du gel d'agarose pour les cellules RAW 264,7 s'appliquent également pour les splénocytes, à l'exception près que l'ADNc des splénocytes est amplifié avec des amorces spécifiques à la GAPDH et à l'IL-12 murine, plutôt qu'à l'IL-1 murine.

3. Évaluation du potentiel immunomodulateur *ex vivo* et *in vivo*

3.1 Modèle murin de gavage

Des souris saines BALB/C femelles âgées entre 6 et 8 semaines (Charles River) sont hébergées au centre de biologie expérimentale (CBE) dans des conditions conformes aux normes internationales, dont celles des bonnes pratiques de laboratoire. Les souris sont maintenues dans un environnement où la température et l'humidité sont contrôlées, la lumière réglée sur un cycle de 12/24 heures, et la nourriture et l'eau sont données *ad libitum*. Après une semaine d'acclimatation, les souris sont gavées pendant 10 jours consécutifs, à raison de 5 ml/kg/jour d'une solution composée soit d'eau ou d'EPS lot ABE1 1% (p/v). Un groupe de souris gavées avec une solution 1% (p/v) de β -(1,3-1,4)-glucan isolé d'avoine est ajoutée dans certaines expériences. Le jour suivant le dernier gavage (jour 11), les souris sont anesthésiées avec 10 ml/kg d'un mélange de kétamine (100 mg/ml) et de xylazine (20 mg/ml) et ensuite sacrifiées par dislocation cervicale.

3.2 Iléon

Afin de doser l'IL-18 murine produite par l'iléon, 6 cm d'iléon sont prélevés à partir du caecum et les fèces sont enlevées à l'aide d'une pince. L'intérieur de l'iléon est d'abord rincé avec 200 μ l de RPMI, et ensuite la contamination microbienne est contrôlée en déposant l'iléon dans un microtube 1,5 ml, contenant 1 ml de PBS 1% (v/v) pénicilline/ streptomycine et 4% (v/v) FBS. L'iléon est ensuite transféré dans un tube de 5 ml contenant 1,5 ml de RPMI supplémenté, pour être polytroné pendant 20 secondes. Après une centrifugation de 15 minutes à 10 000 x g à 4°C, le surnageant est aliquoté en 120 μ l et congelé immédiatement à -70°C. Il faut noter que l'iléon est toujours conservé sur glace pendant les manipulations, afin de préserver les cytokines.

3.3 Splénocytes

Suite au gavage, la rate de quatre souris est également prélevée de façon stérile et les splénocytes de chaque rate sont isolés indépendamment, selon le protocole décrit dans la section 2.2.1 du chapitre 2. Après un décompte en cytométrie, la suspension cellulaire est ajustée à 300 000 cellules vivantes/ml et 2 ml de cellules sont distribués dans les puits d'une plaque de 12 puits. De l'IL-2 murine (MSJ BioLynx), une cytokine qui permet l'activation et la prolifération des lymphocytes T, est ajoutée à une concentration finale de 1,25 ng/ml. La ConA, un mitogène non spécifique des lymphocytes T, est également ajoutée à une concentration finale de 5 µg/ml. Les splénocytes sont incubés à 37°C dans une atmosphère saturée en eau et enrichie à 5% de CO₂, pendant 24 ou 48 heures. Après l'immunostimulation, un décompte des splénocytes viables est effectué en cytométrie. Les splénocytes sont ensuite centrifugés et le surnageant est distribué en aliquots de 120 µl, qui sont immédiatement congelés à -70°C. Trois cytokines (IL-10, IL-4 et l'IFN-γ) seront ultérieurement dosées dans ces surnageants par essai d'un immunoabsorbant lié aux enzymes (ELISA).

3.4 ELISA

Des tests ELISA sont effectués pour doser l'IL-18 murine (Bender MedSystems) dans le surnageant des iléons polytronés ainsi que l'IL-4 murine (Pierce Endogen), l'IL-10 et l'IFN- γ murin (OptEIA de BD) dans le surnageant des splénocytes. Voici d'abord une brève description de la procédure suivie pour les tests ELISA provenant de Bender MedSystems, suivie de celle employée pour les tests provenant de BD.

Pour doser l'IL-18, la plaque vendue avec l'anticorps primaire déjà fixé est d'abord lavée deux fois avec la solution de lavage et asséchée correctement. Ensuite, 100 μ l/puits de diluant pour échantillon (fourni par Bender MedSystems) sont déposés dans les puits servant de blanc et dans ceux destinés à recevoir une solution standard d'IL-18. Le standard de 2000 pg/ml d'IL-18 est ajouté dans deux de ces puits, à raison de 100 μ l/puits, puis 100 μ l de ce standard est transféré dans un autre puits, contenant déjà 100 μ l de diluant pour échantillon. Ces étapes sont répétées pour obtenir une courbe standard de 1000-15,6 pg/ml, en duplicata. Puis, 50 μ l/puits de diluant pour échantillon sont ajoutés à tous les autres puits, et 50 μ l/puits de surnageant des splénocytes en culture sont ensuite ajoutés. Une fois que les standards ou les surnageants ont été déposés dans tous les puits, 50 μ l/puits de biotine conjuguée à l'anticorps secondaire sont ajoutés et la plaque est incubée 2 heures à TP sur une plaque agitatrice, recouverte d'une pellicule transparente autocollante. Après l'incubation, la plaque est lavée 3x avec la solution de lavage et 100 μ l/puits de streptavidine-HRP sont ajoutés. La plaque est encore incubée 1 heure à TP sur une plaque agitatrice, recouverte d'une pellicule transparente autocollante. Finalement, la plaque est lavée 3x avec la solution de lavage, 100 μ l/puits de substrat (TMB) sont ajoutés et la plaque est incubée 20 minutes à TP dans le noir sur un agitateur. La réaction est arrêtée en ajoutant 100 μ l/puits de solution d'arrêt et la plaque est alors lue à 450 nm.

Pour doser l'IL-4, 50 μ l/puits de diluant pour échantillon (fourni par Pierce Endogen) sont ajoutés dans tous les puits, suivi de 50 μ l/puits de standard (15-375 pg/ml) ou de surnageant de splénocytes en culture. La plaque est ensuite recouverte d'une pellicule en plastique, incubée à 37°C pendant 2 heures, puis lavée 5x avec le tampon de lavage. L'anticorps secondaire conjugué à la biotine et l'enzyme HRP (péroxydase isolée du raifort ou *horseradish peroxidase*) couplée à la streptavidine est alors ajouté à raison de 100 μ l/puits, la plaque est recouverte d'une pellicule en plastique et incubée 1 heure à 37°C, puis lavée 5x avec le tampon de lavage. Finalement, 100 μ l/puits du substrat 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB) sont ajoutés et la plaque est incubée 30 minutes à TP dans le noir. La réaction est arrêtée en ajoutant 100 μ l/puits de solution d'arrêt et l'absorbance est lue à 450 nm. Tous les produits utilisés sont fournis par Pierce Endogen déjà dilués, à l'exception du standard qui doit être reconstitué dans le milieu de culture utilisé pour les splénocytes.

Pour doser l'IL-10 et l'IFN- γ , l'anticorps primaire dilué dans un tampon approprié et selon la dilution suggérée par BD, est déposé à raison de 100 μ l/puits dans une plaque de 96 puits, et incubé 18 heures à 4°C. La plaque est ensuite lavée et bloquée pendant 1 heure à TP avec 200 μ l/puits de diluant pour échantillon. Après plusieurs lavages, 100 μ l de surnageant ou de standard sont déposés dans chacun des puits et la plaque est incubée 2 heures à TP. Elle est ensuite lavée plusieurs fois et 100 μ l/puits d'anticorps secondaire couplé à la biotine et d'enzyme HRP couplée à la streptavidine sont déposés dans chaque puits. La plaque est incubée 1 heure à TP, ensuite lavée plusieurs fois, et 100 μ l/puits de TMB sont ajoutés et le tout est incubé 30 minutes à la noirceur. La réaction est arrêtée par l'ajout de 50 μ l/puits de solution d'arrêt et la plaque est lue à 450 et à 560 nm. Le blanc et les standards sont testés en duplicata. La courbe standard permet de déterminer la quantité de cytokines (pg) présentes dans les surnageants.

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

1. Production et caractérisation physique et chimique de l'exopolysaccharide

1.1 Rendements et contenu

Trois lots d'EPS ont été produits (tableau 3), à partir de ferments congelés de la souche *Lb. kefiranofaciens* INIX. Le rendement moyen obtenu est de 503 ± 82 mg d'EPS par litre de milieu de culture.

Tableau 3 : Rendements de production et composition de différents lots d'EPS

Lots d'EPS	Rendement ¹ (mg/l)	Production nette d'EPS (mg)	Contenu en sucre ² (% p/p ³)	Contenu en protéines ⁴ (% p/p)
ABE1	586	2636	92	1,65
ABE2a	474	710	88	3,1
ABE2b	527	790	83	2,5
ABE3	423	2688	80	1,9

¹ Les rendements sont exprimés en mg d'EPS lyophilisé par litre de milieu de culture.

² Le contenu en sucre a été déterminé par la méthode de Dubois (voir section 1.3.1 du chapitre 2)

³ p/p : poids/poids

⁴ Le contenu en protéines a été déterminé par la méthode de Lowry

1.2 Fractionnement par poids moléculaire

Le fractionnement par poids moléculaire effectué sur des membranes de porosité allant de 10 à 500 kDa montre que le poids moléculaire de l'EPS du lot ABE1 est supérieur à 500 kDa.

1.3 Analyse élémentaire

Les EPS des lots ABE1 et ABE2b ont été soumis à une analyse élémentaire effectuée à l'Université de Montréal et les résultats obtenus (tableau 4) sont comparés à ceux rapportés par Shiomi M. *et al.*, 1982 pour le kéfiran.

Tableau 4 : Pourcentage de certains atomes des lots d'EPS ABE1 et ABE2b et du kéfiran

Lots d'EPS	% (p/p) de différents atomes			
	Carbone	Hydrogène	Azote	Soufre
ABE1 ¹	39,20	6,88	0,28	0,00
ABE2b ¹	37,61	6,79	0,83	0,00
Kéfiran ²	41,83	6,19	0,20	

¹ Analyses effectuées par le service d'analyse élémentaire de l'Université de Montréal

² (Shiomi, Sasaki et al. 1982)

1.4 HPLC

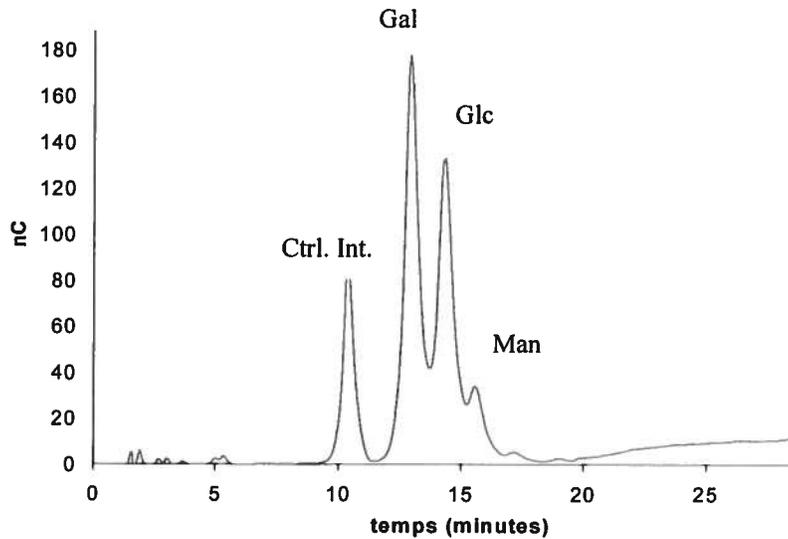


Figure 3 : Profil HPLC type après hydrolyse acide de l'EPS lot ABE1
 Ctrl. int. : D (-) arabinose 100 μ M, Gal : D (+) galactose, Glc : D (+) glucose, Man : D (+) mannose

La figure 3 montre un profil standard d'élution, représentatif de celui obtenu pour les 3 lots d'EPS analysés. L'analyse par HPLC indique que l'EPS de chacun des trois lots est composé de trois résidus monosaccharidiques distincts, soit le D (+) glucose, le D (+) galactose et le D (+) mannose. La présence de ces trois résidus a été confirmée par une analyse H-RMN faite au CNRC-ISB, à Ottawa. À l'aide de la courbe standard et de l'aire sous la courbe de chaque pic, il est possible de déterminer la proportion relative de chaque résidu. Les résultats sont présentés dans le tableau 5. Les proportions relatives entre les résidus D (+) glucose et D (+) galactose de l'EPS se rapprochent de celles du kéfiran, soit en moyenne 1 : 1,07 vs 1 : 1,22. Le kéfiran est par contre exempt de résidus D (+) mannose, présents à environ 10% dans l'EPS d'INIX.

Tableau 5 : Proportion relative des résidus monosaccharidiques qui composent l'EPS de chacun des trois lots testés.

Lots d'EPS	Proportions relatives des résidus monosaccharidiques		
	D (+) Glucose	D (+) Galactose	D (+) Mannose
ABE1	1,00 (44%)	1,05 (47%)	0,20 (9%)
ABE2	1,00 (42%)	1,09 (46%)	0,29 (12%)
ABE3	1,00 (44%)	1,06 (47%)	0,20 (9%)

1.5 H-RMN

Une résonance magnétique nucléaire (H-RMN) a été effectuée pour analyser les liaisons monosaccharidiques de l'EPS du lot ABE1, par per-méthylation, suivie d'une hydrolyse, d'une acétylation et d'une analyse par GC-MS, le tout effectué par l'équipe du Dr Michel Gilbert Ph.D (CNRC, Ottawa). Le spectre obtenu est présenté à la figure 4 et les liaisons présentes dans l'EPS, qui ont été déduites à partir de ce spectre par l'équipe du Dr Gilbert, sont détaillées dans le tableau 6. Ces résultats montrent, tout comme ceux obtenus par HPLC, que l'EPS produit par INIX contient du D (+) glucose et du D (+) galactose dans un rapport (environ équimolaire) semblable à ceux rapportés pour le kéfiran, soit 1 :1,22 par Micheli L. *et al.* (1999). Toutefois, l'EPS d'INIX contient en plus environ 10% de résidus D (+) mannose. Tous les liens entre les résidus monosaccharidiques du kéfiran sont présents dans l'EPS (voir No. 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 du tableau 6 vs figure 1 du chapitre 1 section 3.1). Toutefois, il y a plus de liaisons monosaccharidiques dans l'EPS que dans le kéfiran. Nous proposons donc que les hexoses substitués en position C2 ou C2 et C6, qui sont absents du kéfiran, soient un résidu D (+) mannose de la chaîne principale, sur lequel peut se substituer un glucose. Ce résidu mannose ne fait pas toujours parti de la sous-unité répétitive, car il ne représente que 10% des sucres.

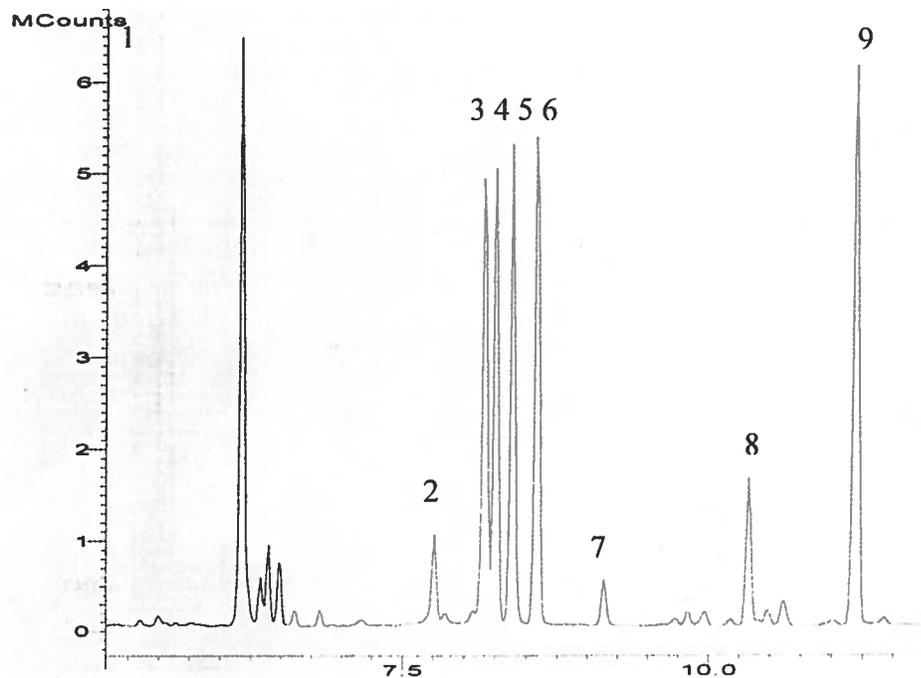


Figure 4 : Spectre H-RMN pour l'analyse des liens entre les monosaccharides de l'EPS lot ABE1

Tableau 6 : Liaisons présentes dans l'EPS d'INIX (assignation faite par l'équipe du Dr Gilbert)

No.	Lien des sucres
1	Glucose non substitué
2	Hexose (mannose) substitué en C2
3	Glucose substitué en C4
4	Galactose substitué en C4
5	Glucose substitué en C6
6	Galactose substitué en C3
7	Galactose substitué en C6
8	Hexose (galactose) substitué en C2 et C6
9	Hexose (mannose) substitué en C2 et C6

2. Évaluation du potentiel immunomodulateur de l'EPS *in vitro*

2.1 Cellules macrophagiques RAW 264,7

Cette lignée cellulaire a été stimulée pendant 24 heures soit avec l'EPS du lot ABE1 (100 ou 1000 µg/ml), soit avec un contrôle induisant une stimulation (LPS 10 ou 100 µg/ml), soit avec un contrôle négatif. L'ARN total a ensuite été extrait par un agent de lyse, le TRIzol, transcrit inversement par la M-MuLV et amplifié avec des amorces spécifiques à l'interleukine 1 murine (IL-1) et avec les amorces universelles amplifiant la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Ces dernières ont le rôle de contrôle interne : elles permettent de valider le bon fonctionnement du RT-PCR pour chacun des échantillons. La figure 5 illustre le résultat de la migration de l'ADN amplifié sur gel d'agarose 0,9% (p/v). L'intensité semblable des fragments amplifiés par les amorces GAPDH montre que le RT-PCR a été effectué correctement et de façon équivalente pour tous les échantillons. Le contrôle positif de stimulation, soit le lipopolysaccharide (LPS), stimule clairement l'expression d'IL-1 chez les macrophages murins en culture. Par contre, l'EPS du lot ABE1 ne stimule pas l'expression d'IL-1, aux concentrations utilisées.



Figure 5 : Profil de migration d'ADNc amplifié avec des amorces IL-1 et GAPDH, obtenu par transcription inverse d'ARN total, extrait de RAW 264,7 stimulés 24 heures avec différents produits

2.2 Splénocytes

Cette lignée cellulaire primaire a été immunostimulée en culture avec deux contrôles positifs de stimulation (LPS et ConA), un contrôle négatif de stimulation (aucun stimulant), ainsi qu'avec l'EPS du lot ABE1 pendant 6 heures. L'ARN total des splénocytes a ensuite été extrait, transcrit de façon inverse et amplifié par PCR avec des amorces spécifiques à l'IL-12 et au GAPDH. Les fragments amplifiés ont été déposés dans un gel d'agarose 0,9% (p/v) coloré au bromure d'éthidium et lu sous UV. On peut voir à la figure 6 que l'EPS, à 50 µg/ml (puits 4), stimule la transcription d'IL-12, tout comme les contrôles positifs de stimulation (puits 2 et 3). L'absence de stimulant dans le puits 1 confirme que l'IL-12 n'est pas une cytokine exprimée de façon constitutive.

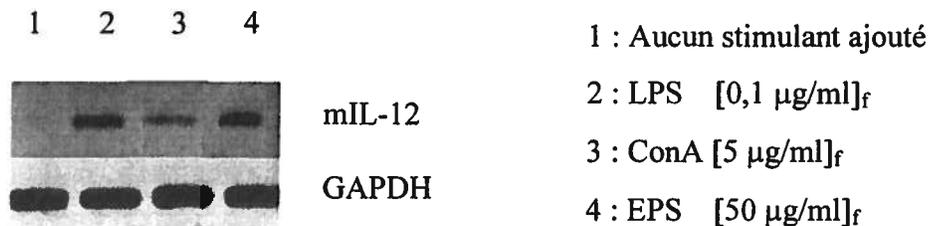


Figure 6 : Migration sur gel d'agarose 0,9% (p/v) de l'ADN amplifié avec des amorces IL-12 et GAPDH, obtenu par transcription inverse d'ARN extrait de splénocytes stimulés avec différents produits pendant 24 heures

3. Évaluation du potentiel immunomodulateur de l'EPS *in vivo* et *ex vivo*

3.1 Iléon (*in vivo*)

La figure 7 montre que le gavage avec une solution d'EPS 1% (p/v) pendant 10 jours augmente la production d'IL-18 (2207 ± 117 pg/ml vs 1601 ± 167 pg/ml) dans l'iléon de souris BALB/C comparativement au gavage à l'eau, et ce de façon statistiquement significative. Il est normal que l'IL-18 soit exprimée par les souris gavées à l'eau, car c'est une cytokine transcrite de façon constitutive. C'est le clivage par la caspase-1 qui permet la sécrétion d'une molécule active. L'expression a toutefois été stimulée, comme il est possible de le voir sur ce graphique, pour les souris qui ont été gavées avec l'EPS.

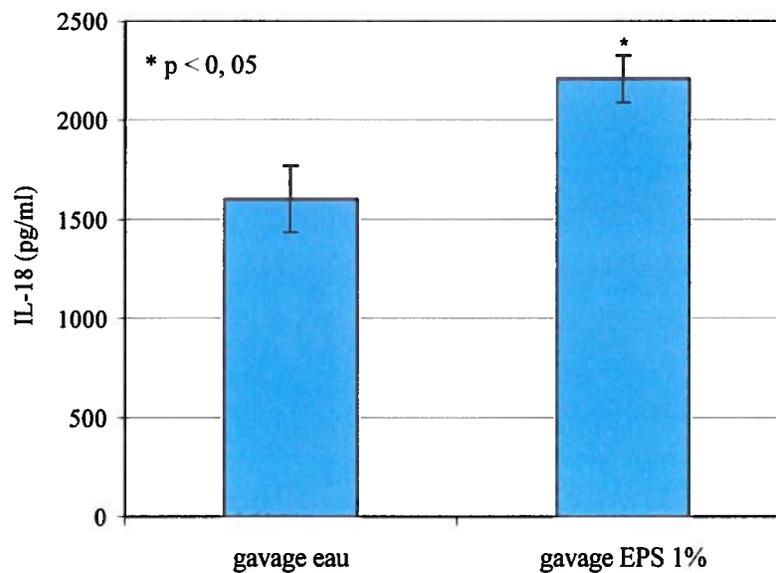


Figure 7 : Dosage par ELISA d'IL-18 dans l'iléon de souris BALB/C gavées 10 jours avec une solution de 5ml/kg/jour soir d'eau, soit d'EPS 1% (p/v) lot ABE1

3.2 Splénocytes (*ex vivo*)

3.2.1 IL-4, IL-10 et IFN- γ

Les figures 8, 9 et 10 présentent les résultats obtenus suite à l'analyse des surnageants de splénocytes isolés de 4 souris par groupe de gavage, mis en culture séparément, en triplicata, dont l'IL-4, l'IL-10 ou l'IFN- γ ont ensuite été respectivement dosés par ELISA. Il se dégage de ces figures une tendance de sécrétion à la baisse pour ces trois cytokines par les splénocytes isolés de souris gavées pendant 10 jours avec une solution d'EPS 1% (p/v) ou de β -glucan 1% (p/v) et stimulés en culture avec de la ConA et de l'IL-2, par rapport aux splénocytes isolés de souris gavées à l'eau, que ce soit après 24 ou 48 heures de culture. Cette tendance est statistiquement significative pour l'IL-10 et l'IFN- γ sécrétés par les souris gavées aux EPS.

Il est normal d'observer une sécrétion de ces trois cytokines par tous splénocytes, peu importe leur provenance, car ils ont tous été cultivés en présence de ConA, un mitogène non spécifique des lymphocytes T, qui stimule entre autres la sécrétion de d'IL-4, d'IL-10 et d'IFN- γ . C'est pourquoi les résultats présentés dans ces graphiques sont analysés en comparaison des niveaux de sécrétion des splénocytes isolés des souris gavées à l'eau, et non en valeur absolue.

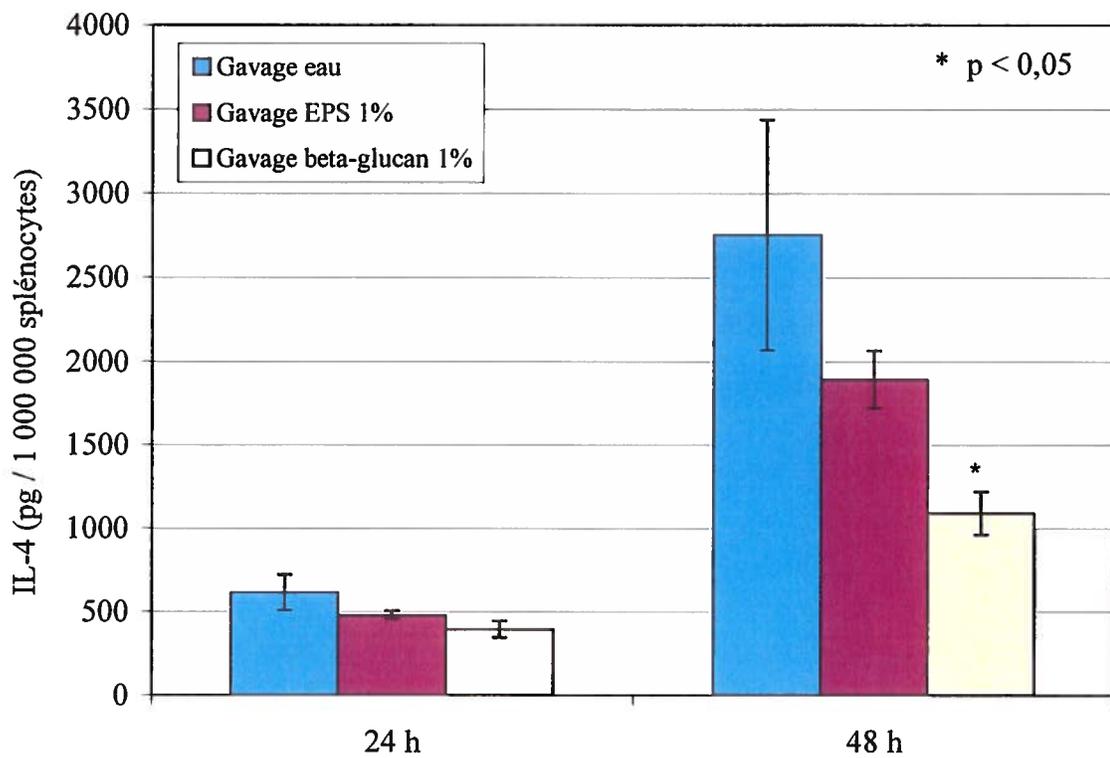


Figure 8 : Production d'IL-4 par des splénocytes isolés de souris BALB/C gavées pendant 10 jours et ensuite stimulés en culture avec 5ug/ml de ConA et 1,25 ng/ml d'IL-2

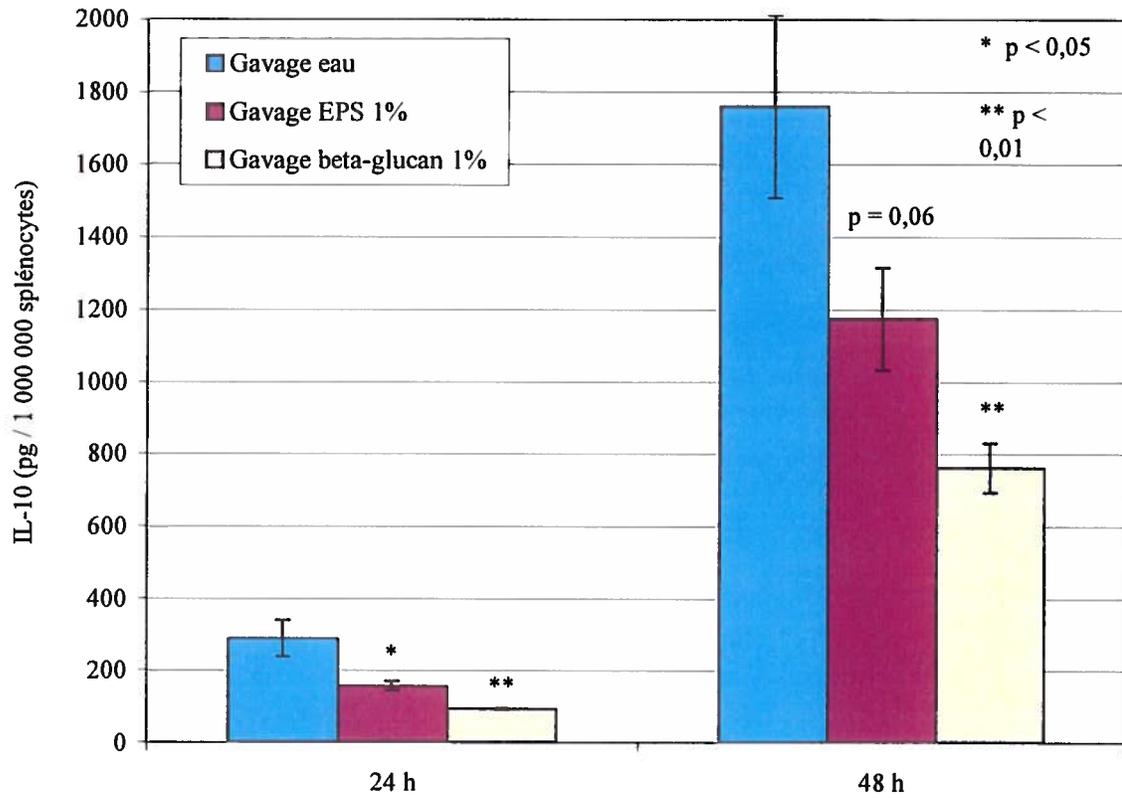


Figure 9 : Production d'IL-10 par des splénocytes isolés de souris BALB/C gavées pendant 10 jours et ensuite stimulés en culture avec 5ug/ml de ConA et 1,25 ng/ml d'IL-2

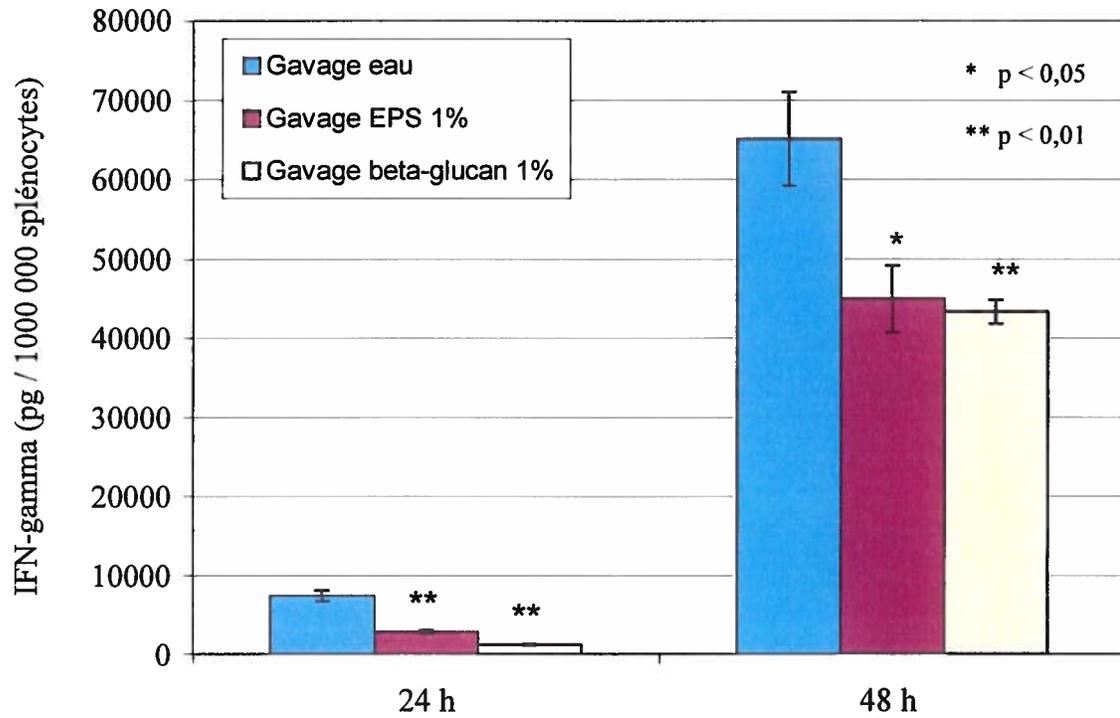


Figure 10 : Production d'IFN- γ par des splénocytes isolés de souris BALB/C gavées pendant 10 jours et ensuite stimulés en culture avec 5 μ g/ml de ConA et 1,25 ng/ml d'IL-2

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Lb. kefiranofaciens synthétise un polysaccharide, le kéfiran, qui constitue sa capsule, et qui est également sécrété dans son milieu. Dans le cadre des recherches qui sont discutées ici, seul le polysaccharide sécrété a été purifié et non celui de la capsule. Des travaux antérieurs ont permis d'isoler quatre souches de *Lactobacillus kefiranofaciens* à partir de grains de kéfir. Parmi celles-ci, c'est la souche INIX qui a été choisie pour étudier l'EPS, étant donné qu'elle le sécrète en grande quantité par rapport aux trois autres souches (meilleur rendement 585 mg/l). De plus, INIX se situe dans la limite supérieure de production d'EPS des bactéries lactiques (LAB) ainsi que des autres souches productrices de kéfiran, qui produisent respectivement de 45-600 mg/l (De Vuyst et Degeest 1999) et 57,2-460 mg/l (Mukai 1990; Rimada et Abraham 2001; Frengova, Simova et al. 2002). Effectivement, la production d'exopolysaccharides par les LAB est généralement faible et instable, ce qui confère à INIX toute son importance, car en plus de produire des quantités appréciables d'EPS, elle conserve cette caractéristique à travers les générations. L'instabilité de la synthèse d'EPS par les LAB pourrait s'expliquer par la perte du plasmide chez les LAB mésophiles et par un remodelage ou des délétions chromosomiques chez les LAB thermophiles, résultant d'une instabilité génétique (Cerning 1990). Il serait donc intéressant, dans la continuité de ce projet de recherche, de vérifier la localisation des gènes codant pour les EPS chez INIX, une LAB mésophile.

Il faut toutefois noter qu'il serait probablement facile d'augmenter encore davantage la synthèse d'EPS par INIX en concentrant nos efforts sur l'optimisation du procédé de fermentation. Des rendements plus élevés lors de la production du kéfiran sont en effet rapportés par divers groupes de recherche. Parmi les stratégies utilisées, on retrouve une durée de fermentation plus élevée (5 à 10 jours) (Micheli, Uccelletti et al. 1999; Maeda, Zhu et al. 2004), l'utilisation d'une vaste étendue de milieux de culture peu conventionnels (Cheirsilp, Shimizu et al. 2001; Maeda, Zhu et al. 2004), l'ajustement du pH en cours de culture (Maeda, Zhu et al. 2004) et les co-cultures, le plus souvent avec des micro-organismes présents naturellement dans les grains de kéfir (Rimada et Abraham 2001; Frengova, Simova et al. 2002; Cheirsilp, Shimizu et al. 2003).

Il existe également des méthodes de purification permettant d'éliminer les traces de protéines retrouvées dans l'EPS produit par INIX (1,3 – 3,1% p/p). Cette contamination pourrait être éliminée par une méthode de purification subséquente, comme par exemple la chromatographie échangeuse de cations DEAE (Mukai 1990; Maeda, Zhu et al. 2004). Toutefois, l'optimisation des méthodes de production et de purification sont des procédés qui peuvent constituer en soit un projet de recherche et l'objectif recherché dans ce projet-ci est davantage la détermination du potentiel immunomodulateur de l'EPS. Une fois que ce potentiel aura été déterminé, il sera alors pertinent de poursuivre dans nos investigations et d'optimiser des méthodes permettant une production accrue et plus pure de l'EPS. La précipitation à l'éthanol utilisée pour l'obtention de l'EPS est une méthode classique et très répandue. Comme elle permet une purification brute, il est normal que le dosage de protéines montre une légère contamination. Kimmel et Roberts (1998) ont rapporté qu'en appliquant la même méthode que celle utilisée pour l'obtention du lot ABE2, ils ont isolé un EPS contenant 1,42% (p/p) de protéines. Ils expliquent que des protéines ont probablement été entraînées avec l'EPS lors de la purification, mais qu'elles n'y seraient pas attachées et qu'elles pourraient donc facilement être éliminées.

Le fractionnement par poids moléculaire montre que l'EPS produit par INIX est supérieur à 500 kDa. Ces données corroborent les résultats rapportés récemment par Maeda, Zhu et al. (2004), qui ont obtenu suite à une chromatographie par perméation de gel (DAWN-E MALLS photometer) un poids moléculaire de 760 kDa pour le kéfiran. Un autre groupe de recherche utilisant la filtration sur gel par HPLC (colonne Asahipak GS-710) rapporte que le kéfiran serait composé de polysaccharides de poids moléculaire hétérogène, dont les principaux seraient de 1×10^6 et 4×10^6 kDa (Mukai, Toba et al. 1990). Le milieu et les conditions de culture peuvent influencer grandement la nature, la longueur et la quantité d'EPS produits, ce qui pourrait expliquer les différences observées entre ces études. La chromatographie permettrait de déterminer si INIX sécrète une population d'EPS de poids moléculaire hétérogène, ainsi que celui-ci de façon précise.

L'analyse élémentaire de l'EPS est comparable à celle rapportée pour le kéfiran (Shiomi, Sasaki et al. 1982). Toutefois, les analyses HPLC et H-RMN semblent démontrer que l'EPS produit par INIX est probablement un kéfiran mannosylé. En effet, l'EPS d'INIX est composé de résidus D (+) glucose et D (+) galactose dans une proportion semblable à celle du kéfiran rapportée par Micheli, Uccelletti et al. (1999) (1 : 1,07 vs 1 : 1,22) et tous les liens qui unissent les résidus dans le kéfiran sont présents dans l'EPS. Toutefois, l'EPS contient en plus environ 10% de résidus D (+) mannose, ainsi que des liens entre les sucres supplémentaires (hexose substitué en C2 ou C2 et C6), qui sont tous deux absents du kéfiran. Nous postulons donc que ces liaisons impliquent des résidus D (+) mannose et que par conséquent, l'EPS sécrété par INIX serait donc un kéfiran dont la chaîne principale est mannosylée à environ 10%. En partant de cette hypothèse, le branchement du résidu glucose pourrait se faire sur un résidu mannose, car l'analyse H-RMN a permis de détecter des mannoses doublement substitués, soit en C2 et C6.

Plusieurs groupes de recherche distincts confirment qu'ils ont isolé du kéfiran parce que leur polysaccharide est composé de résidus D (+) glucose et D (+) galactose dans un rapport allant de 1 : 0,94 (Frengova, Simova et al. 2002) à 1 : 22 (Mukai, Toba et al. 1990; Micheli, Uccelletti et al. 1999), en passant par 1 : 1 (La Riviere et Kooiman 1967) et 1 : 1,05 (Maeda, Zhu et al. 2004). Certains auteurs rapportent que la chaîne principale du kéfiran varie en taille et en composition : penta, hexa ou heptasaccharide, branché ou non, avec un ou deux résidus, qui sont soit des résidus D (+) glucose, soit D

(+) galactose. Toutes ces variations peuvent expliquer les différences rapportées dans la littérature quant au rapport glucose/galactose du kéfiran et par conséquent, notre rapport 1 : 1,07 au lieu de 1 : 1,22 n'infirmes pas notre hypothèse, soit que l'EPS est un kéfiran mannosylé. Cette hypothèse est également en accord avec les résultats obtenus suite à l'analyse élémentaire de l'EPS. En effet, étant donné que le mannose est un isomère du glucose et du galactose, il possède la même formule atomique que ceux-ci et sa présence n'influence donc pas le pourcentage de chacun des atomes présents dans l'EPS produit par INIX.

Une fois l'EPS produit et caractérisé, le lot ABE1 a été choisi dû à sa pureté élevée (92% p/p) pour la suite du projet, soit l'évaluation du potentiel immunomodulateur de l'EPS. En 2001, le groupe de recherche du professeur Daniel Oth, de l'Institut Armand-Frappier, démontrait que les EPS produits par *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulaient l'expression de certaines cytokines, dont l'IL-12 et l'IFN- γ chez les splénocytes (Chabot, Yu et al. 2001). Afin d'atteindre notre deuxième objectif de recherche, nous avons donc évalué, dans un premier temps, la capacité de l'EPS d'INIX à moduler l'expression de certaines cytokines *in vitro*.

Les cellules présentatrices d'antigène (CPA) deviennent activées suite à l'engagement de certains de leurs récepteurs (PRR) avec des motifs particuliers présents sur les micro-organismes (PAMPs). Nous pensons que l'EPS pourrait être reconnu par un de ces récepteurs, et qu'il pourrait ainsi activer le SI inné de façon non spécifique, i.e. par l'activation de récepteurs qui reconnaissent des motifs particuliers, qui ont été conservés à travers l'évolution. L'EPS pourrait se lier au MR qui reconnaît les résidus mannoses terminaux et qui est exprimé sur les macrophages, les cellules dendritiques (CD) et les cellules endothéliales. Toutefois, le MR n'est probablement pas le récepteur le plus susceptible de lier l'EPS produit par INIX, car l'EPS n'a pas de portion peptidique ni lipidique et ne peut donc pas être présenté sur CMH-II ou CD-1, ce qui est normalement le cas des complexes ligands/MR internalisés. Par ailleurs, le MR ne semble pas essentiel à la réponse immunitaire innée. Effectivement, il a été démontré que les souris inactivées (*knock out*) pour le gène du MR ne sont pas plus susceptibles aux infections fongiques (McGreal, Martinez-Pomares et al. 2004). L'EPS, qui est entre autres formé de liaisons β 1,6, pourrait aussi être reconnu par le dectin-1, un récepteur qui reconnaît les

liaisons $\beta 1,3$ et $\beta 1,6$ et qui est présent à la surface des monocytes, des macrophages et des neutrophiles (McGreal, Martinez-Pomares et al. 2004). L'EPS pourrait également se lier au langerin (CD207), qui reconnaît préférentiellement les résidus mannose et qui est exprimé sur les cellules de Langerhans et les CD de la rate et des ganglions lymphatiques. La liaison de l'EPS avec le CD207 pourrait donc activer la CPA et provoquer ainsi la sécrétion d'une gamme de cytokines qui active de façon non spécifique d'autres cellules immunitaires, dont les lymphocytes. Cette activation n'entraîne toutefois pas l'activation d'un clone spécifique, car étant donné que l'internalisation du complexe ligand/langerin ne mène pas à une présentation sur le CMH-II, la reconnaissance spécifique par le TCR ne peut pas avoir lieu.

L'engagement des PRR par l'EPS entraîne l'activation des CPA sur lesquelles ils sont exprimés et conséquemment, la production de plusieurs cytokines, qui rendent compte de l'activation du SI inné de façon non spécifique. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mis une lignée de macrophages murins (RAW 264,7) en présence d'EPS pendant 24 heures et nous avons ensuite évalué le niveau de transcription de l'IL-1, une cytokine pro-inflammatoire précoce exprimée par les CPA activées. Nous avons montré qu'il est possible d'induire la transcription d'IL-1 chez cette lignée cellulaire par l'ajout de LPS (contrôle +), qui induit une transcription d'IL-1 élevée en se liant au TLR4 présent à la surface des macrophages. Cette liaison entraîne l'activation du facteur de transcription $\text{NF}\kappa\text{B}$ qui stimule la transcription de plusieurs gènes impliqués dans l'inflammation, dont l'IL-1.

Aux concentrations utilisées, l'EPS n'induit pas la transcription de l'IL-1. Ce résultat semble indiquer que l'EPS n'induit pas d'inflammation, mais il serait prématuré d'établir une telle conclusion avec une seule évidence, surtout en tenant compte de la méthode de quantification utilisée. En effet, le RT-PCR permet seulement d'évaluer le taux d'ARNm synthétisé. Hors, les ARNm des cytokines ont une vie très courte, due à une séquence d'instabilité $(\text{AUUUA})_n$ dans leur région 3' non traduite, instabilité qui permet une régulation très fine de la synthèse des cytokines par les cellules productrices (Janeway, Travers et al. 2001). Cette limite nous a orienté à sélectionner les tests ELISA préférentiellement au RT-PCR lors du dosage des cytokines produites *in vivo* chez la souris, étant donné qu'ils offrent l'avantage de quantifier la quantité réelle de cytokines

produite. D'autre part, le fait que l'EPS n'induit pas la transcription de l'IL-1 ne signifie pas nécessairement qu'il ne peut activer les CPA, car celles-ci produisent toute une gamme de cytokines lorsqu'elles sont activées, dont le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12 et l'IL-18.

Toujours afin de valider l'activation du SI inné par l'EPS, l'induction de la transcription d'une autre cytokine exprimée par les CPA activée, soit l'IL-12, a été vérifiée par RT-PCR., mais cette fois avec une lignée cellulaire primaire, soit les splénocytes. L'IL-12 est une cytokine qui stimule, de concert avec l'IL-18, la production d'IFN- γ chez les lymphocytes T_{H1}, les cellules NK et les CD. Ainsi, l'ajout d'EPS à [250 μ g/ml], tout comme le LPS et la ConA, a induit la transcription d'IL-12 par les splénocytes, une population hétérogène de cellules immunitaires composées de CPA (macrophages, CD) et de lymphocytes (T et B). Le LPS et la ConA agissent à titre de contrôles positifs, car ce sont deux inducteurs non spécifiques du SI, qui activent respectivement les lymphocytes B et T. La stimulation de la transcription de l'IL-12 semble indiquer que l'EPS d'INIX est en mesure d'activer les CPA et par le fait même, le SI inné, sans nécessairement provoquer d'inflammation. Effectivement, la transcription de l'IL-1 n'est pas induite, du moins, pas dans un contexte immunologique exempt de micro-organismes pathogènes.

Dans l'optique d'étudier les propriétés nutraceutiques ou d'ingrédient actif d'un aliment fonctionnel (ex : le kéfir) tel que l'EPS, il est important de vérifier l'effet qu'il exerce lorsqu'il est consommé par un organisme vivant et qu'il doit passer par le tube digestif. Pour ce faire, nous avons élaboré un modèle de gavage de souris BALB/C femelles, âgées entre 6 et 8 semaines, avec une solution d'EPS 1% (p/v), administrée à raison de 5 ml/kg/jour pendant 10 jours consécutifs. Suite au gavage, la quantité d'IL-18 a été dosée dans l'iléon, la portion terminale inférieure de l'intestin grêle, par un test ELISA. C'est là où la concentration des plaques de Peyer, qui font parti du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT), est la plus élevée. Il est possible que les plaques de Peyer servent de porte d'entrée pour l'EPS, via les cellules M (micropuit), qui captent les antigènes et les micro-organismes de la lumière intestinale et les libèrent dans l'espace extracellulaire du côté de leur membrane basale. L'EPS pourrait donc entrer dans l'organisme par transcytose, grâce aux cellules M, et être reconnu par les cellules

dendritiques des plaques de Peyer. Les CD activées sécrètent des cytokines comme l'IL-18, c'est pourquoi nous avons choisi de doser cette cytokine. La figure 7 montre que le gavage avec une solution d'EPS 1% (p/v) augmente la production d'IL-18 dans l'iléum, et ce de façon significative. Il est donc possible que l'EPS stimule les CPA des plaques de Peyer à produire l'IL-18, ce qui indiquerait une activation du SI inné.

Le fait que l'ajout de l'EPS en culture augmente la transcription d'IL-12 chez les splénocytes et le gavage à l'EPS augmente la production d'IL-18 dans l'iléum semble indiquer d'une part, que l'EPS peut exercer un effet immunomodulateur, et d'autre part, que cet effet se situe probablement au niveau du SI inné. Les CPA font le lien entre le SI inné et adaptatif, en stimulant les lymphocytes. Sachant cela, il serait intéressant d'évaluer si l'effet de l'EPS sur les CPA s'étend aux lymphocytes. C'est le contexte immunologique et surtout la nature des cytokines qui détermine le profil de différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en cellule T_{H1} ou T_{H2}.

Afin de déterminer si le gavage à l'EPS favorise un de ces deux profils de différenciation, les cytokines produites par les cellules T_{H1} (IFN- γ) et T_{H2} (IL-4, IL-10) ont été dosées par ELISA dans le surnageant de splénocytes stimulés avec 5 μ g/ml de ConA et 1,25 ng/ml d'IL-2 pendant 24 heures. Nous avons montré que les splénocytes isolés de souris gavées à l'EPS (et au β -glucan) produisent moins d'IL-4 et d'IL-10 que les splénocytes isolés de souris gavées à l'eau. Étant donné que les profils T_{H1} et T_{H2} sont antagonistes, le fait que le profil T_{H2} ne soit pas favorisé est une indication que le profil T_{H1} l'est. Conséquemment, il serait normal de s'attendre à une augmentation de la sécrétion d'IFN- γ par les splénocytes des souris gavées à l'EPS, ce qui n'est pas le cas. En effet, les splénocytes isolés de souris gavées à l'EPS (et au β -glucan) sécrètent moins d'IFN- γ que ceux isolés de souris gavées à l'eau. Afin d'expliquer ces résultats, nous proposons le modèle hypothétique suivant.

Les lymphocytes T naïfs sont activés par la rencontre de l'antigène spécifique à leur TCR, présenté sur le CMH d'une CPA activée. Un lymphocyte T activé sécrète de l'IL-2, ainsi que la troisième chaîne (α) du récepteur à l'IL-2, qui s'associe au récepteur de faible affinité (β , γ) déjà présent à la surface cellulaire, formant ainsi un récepteur de haute affinité pour l'IL-2. L'IL-2 permet la poursuite du cycle cellulaire du lymphocyte qui peut alors proliférer et se différencier. Après 4 à 5 jours de stimulation autocrine, une

population de lymphocytes T activés effecteurs est obtenue. C'est alors le contexte immunologique, établi entre autres par les cytokines environnantes, qui détermine la différenciation terminale de ces lymphocytes, soit dans un profil T_{H1} en présence d'IL-12 et d'IL-18, soit dans un profil T_{H2} en présence d'IL-4, d'IL-6 ou d'IL-10. Nous avons montré que l'EPS produit par INX stimule l'expression d'IL-12 et d'IL-18. Nous proposons donc que l'EPS, en activant le SI inné de façon non spécifique, favorise un profil de différenciation T_{H1} . Cette hypothèse est renforcée par le fait que les splénocytes isolés de souris gavées à l'EPS sécrètent moins d'IL-4 et d'IL-10 que ceux isolés de souris gavées à l'eau. En effet, ces deux cytokines induisent la différenciation des lymphocytes $CD4^+$ vers un profil T_{H2} et elles sont de plus sécrétées par les cellules T_{H2} différenciées.

L'IL-12 et l'IL-18 peuvent stimuler la différenciation des lymphocytes T en cellules T_{H1} de façon TCR-indépendante, i.e. sans que la réponse immune soit dirigée contre un antigène en particulier. Il est probable que l'EPS d'INX stimule la production d'IL-12 et d'IL-18 en activant le SI inné de façon non spécifique, et que ces cytokines amorcent le processus de différenciation de toute une gamme de clones T_{H0} différents, étant donné que la stimulation est TCR-indépendante, vers un profil T_{H1} . Ce mécanisme a l'avantage d'obtenir des lymphocytes T qui prendront moins de temps à arriver au stade de différenciation terminale en cellules T_{H1} lors de leur rencontre avec l'antigène.

Aussi, il faut garder en mémoire que l'EPS a été administré à des souris saines. Par conséquent, il est normal que ce gavage n'ait pas induit une production d'IFN- γ plus élevée, car l'IFN- γ est une cytokine pro-inflammatoire, qui active les macrophages en augmentant leur capacité phagocytaire, ce qui induit des dommages aux tissus environnants. De plus, pour réitérer une conclusion établie sur les bactéries lactiques, il peut être avantageux de stimuler le SI, mais une activation complète de celui-ci peut entraîner le développement de maladies auto-immunes qui sont indésirables (Sander 1993). Des souris malades pourraient par contre bénéficier d'un gavage à l'EPS, qui pourraient potentiellement favoriser l'établissement d'une réponse de type T_{H1} robuste, un pré-requis d'une défense efficace contre les virus et les bactéries intracellulaires (Bot, Smith et al. 2004).

De plus, les splénocytes n'ont été cultivés que 24-48 heures, alors qu'une stimulation à l'IL-2 de 4-5 jours est nécessaire pour transformer un lymphocyte T activé en cellule effectrice. Récemment, il a été démontré que les macrophages des souris BALB/C, soit celles utilisées lors des expériences de gavage, expriment des taux d'IFN- γ plus faibles, dus à une expression réduite de STAT4, une molécule signalétique qui mène à l'expression d'IFN- γ (Kuroda, Kito et al. 2002). Cette découverte renforce notre hypothèse, car elle signifie que l'EPS produit par INIX surmonte la tendance génétique des souris, en engageant leurs lymphocytes dans un profil de différenciation T_{H1}, malgré leur engagement naturel dans le profil T_{H2}. Par ailleurs, certaines études ont montré que l'ingestion régulière de certains probiotiques, entre autres des souches de *Lactobacillus*, stimule préférentiellement une réponse de type T_{H1}, en augmentant la capacité des splénocytes murins à produire l'IFN- γ (Gill 1998). Les LAB semblent donc exercer un effet qui concorde avec celui observé suite au gavage avec l'EPS, soit un engagement vers un profil T_{H1}. (Kitazawa, Tomioka et al. 1994; He, Morita et al. 2002; Morita, He et al. 2002).

De plus, notre modèle hypothétique est supporté par le fait que le profil de cytokines sécrétées par les splénocytes isolés des souris gavées à l'EPS est semblable à celui des splénocytes isolés de souris gavées au β -glucan, utilisé dans les expériences de gavage comme contrôle positif. Rappelons que le β -glucan est un EPS reconnu pour son potentiel immunomodulateur et dont l'action pro-T_{H1} a été démontrée dans plusieurs études (Inoue, Kodama et al. 2002; Yun, Estrada et al. 2003; Li, Yajima et al. 2004). Brièvement, le β -glucan augmente l'activité des macrophages, en plus de stimuler la production de cytokines pro-T_{H1} (IL-12) et d'IFN- γ , une cytokine sécrétée par les CD, les cellules NK et les lymphocytes CD4⁺ T_{H1}. Comme le gavage à l'EPS et au β -glucan semble exercer un effet comparable sur les splénocytes murins, il serait légitime de croire que l'EPS pourrait, suite à une stimulation du SI inné, engager la différenciation des cellules T vers un profil T_{H1}.

Le fait qu'un gavage à l'EPS induise un changement au niveau du profil de sécrétion de cytokines des splénocytes signifie que l'EPS exerce, en plus de l'effet local observé au niveau de l'iléon, un effet systémique. Maintenant, il reste à déterminer si cet

effet systémique est dû au passage de l'EPS en circulation. L'EPS produit par INIX est un polysaccharide de plus de 500 kDa, formé de liaisons β -(1-6), β -(1-2), β -(1-4) et β -(1-3). L'homme ne possède pas d'enzyme digestive hydrolysant les liaisons β , à l'exception de la lactase qui hydrolyse seulement les liens β 1-4 du disaccharide lactose, entre le glucose et le galactose. Conséquemment, si l'EPS est digéré dans notre tube digestif, il faut que ce soit par des enzymes sécrétées par la flore intestinale. Par contre, il est possible que l'EPS puisse traverser la barrière intestinale à l'aide des cellules qui permettent le transport des macromolécules, soit les cellules M, les CD et les entérocytes. En effet, Murofushi, Mizuguchi et al. (1986) ont gavé des souris avec du kéfiran tritié et 3 heures après le gavage, ils ont retrouvé du ^3H dans tous les organes, mais surtout dans les reins, le foie et le sang. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que le kéfiran passe en circulation, malgré son poids moléculaire élevé, par une des voies d'entrée du système digestif, ou encore qu'il est partiellement dégradé par les enzymes de la flore intestinale et qu'ensuite il passe en circulation.

Perspectives pour vérifier les hypothèses

Afin de vérifier l'hypothèse émise sur l'engagement des lymphocytes T CD4⁺ dans un profil de différenciation T_H1, nous proposons une expérience complémentaire qui pourrait être réalisée. Suite au gavage de souris BALB/C avec une solution de 5 ml/kg/jour d'EPS 1% (p/v), de β-glucan 1% (p/v) (contrôle positif) ou d'eau (contrôle négatif) pendant 10 jours consécutifs, la rate est prélevée pour l'isolement des splénocytes, à partir desquels les lymphocytes T CD4⁺ seront purifiés (Ficoll). Ces lymphocytes seront mis en culture en présence de ConA et d'IL-2, mais avec en plus une concentration croissante d'IL-12 et d'IL-18, 2 cytokines pro-IFN-γ. L'IFN-γ sera ensuite dosé par ELISA dans le surnageant de culture, après 24, 48 et 72 heures. Si le gavage à l'EPS engage réellement les lymphocytes T dans un profil de différenciation T_H1, les lymphocytes isolés de souris gavées à l'EPS devraient produire plus d'IFN-γ que ceux isolés de souris gavées à l'eau, pour une même concentration d'IL-12 et d'IL-18 ajoutée en culture. La même expérience devra aussi être effectuée avec de l'IL-4 et de l'IL-10 en remplacement d'IL-12 et d'IL-18. Dans cette expérience, une cytokine sécrétée par les cellules T_H2, autre que l'IL-4 et l'IL-10, devra être dosée par ELISA, par exemple l'IL-5 ou l'IL-13. Notre hypothèse pourrait être confirmée si une concentration plus élevée d'IL-4 et d'IL-10 est nécessaire pour la sécrétion d'IL-5/IL-13, par les lymphocytes isolés de souris gavées à l'EPS.

D'autre part, les expériences de gavage ont été effectuées sur des souris saines. Comme discuté plus haut, l'effet de l'EPS serait certainement plus évident s'il était donné à des souris malades. Nous proposons donc deux modèles animaux qui permettraient d'une part, d'infirmier ou de confirmer notre modèle hypothétique et d'autre part, d'évaluer les effets certainement plus prononcés de l'EPS sur des animaux malades.

La première expérience serait basée sur un modèle analogue à l'asthme chez l'humain. Il consiste à d'abord sensibiliser la souris, pour ensuite provoquer une réaction antigénique qui induit une inflammation éosinophilique des voies aériennes associée à une réponse immunitaire de type T_H2, avec production d'IgE spécifiques à l'allergène (Delayre-Orthez, de Blay et al. 2004). Il a déjà été démontré qu'un traitement capable de réorienter la réponse immunitaire vers un profil T_H1 est défavorable pour le

développement de l'asthme (Choi et Koh 2002; Choi et Koh 2003). Il serait donc intéressant d'évaluer l'impact de l'EPS produit par INIX sur ce modèle animal.

La deuxième expérience serait basée sur un modèle d'hypersensibilité retardée dans une dermatite de contact provoquée par l'oxazolone. Cette maladie est causée par un recrutement de cellules T_H1 qui entraîne une inflammation locale, là où l'oxazolone est appliquée. Un gavage à l'EPS pourrait, dans ce cas-ci, accentuer le développement de la dermatite. Par ailleurs, il faut noter que la dose d'EPS administrée, ainsi que le mode d'application, par exemple intragastrique (*i.g.*) ou local, peuvent influencer grandement l'effet de celui-ci. Effectivement, la présentation d'un antigène à faible dose favorise habituellement l'activation des cellules T_H2 , alors que le même antigène peut favoriser une réponse de type T_H1 s'il est présenté à forte dose. De plus, il est possible qu'une solution d'EPS appliquée localement ait un effet plus marqué que s'il doit passer par le tube digestif pour ensuite être dilué dans la circulation, si toutefois il passe en circulation.

Nous avons montré que le gavage avec une Matrice Protéique Malléable (MPM), composée entre autres de l'EPS présenté dans ce mémoire, exerce un effet anti-inflammatoire et aide à contrer les conséquences de la dermatite. Ces résultats démontrent toute l'importance d'étudier l'EPS produit par INIX dans des modèles animaux de déséquilibre immunitaire.

Perspectives d'application

Avec son potentiel immunomodulateur, l'EPS produit par INIX pourrait facilement trouver plusieurs applications dans diverses sphères de la santé. Il pourrait être consommé sous forme de supplément, en tant que nutraceutique, ou encore ajouté à certains aliments, qui pourraient alors être qualifiés d'aliments fonctionnels, dont l'ingrédient actif serait l'EPS. En outre, l'EPS pourrait être consommé en prophylaxie par des gens qui ont souvent tendance à contracter des maladies virales (ex : grippe, rhume). En effet, les cellules T_H1 stimulent surtout l'immunité cellulaire, en activant les macrophages, qui peuvent alors plus efficacement éliminer les micro-organismes intracellulaires comme les virus ou les bactéries intracellulaires. L'EPS pourrait également servir à stimuler de façon non spécifique le SI des personnes âgées, car il est connu que notre SI s'affaiblit avec l'âge (Koch, Kempf et al. 2005).

CONCLUSION

INIX est une souche de *Lb. kefiranofaciens* qui sécrète de grandes quantités d'EPS, qui suite aux analyses effectuées, semble être un kéfiran mannosylé à environ 10% de plus de 500 kDa. Cet EPS peut induire la transcription d'IL-12 chez des splénocytes, lorsqu'il est ajouté à une concentration de 50 µg/ml au milieu de culture pendant 24 heures. Il stimule également la production d'IL-18 dans l'iléon de souris BALB/C gavées avec une solution d'EPS 1% (p/v) pendant 10 jours consécutifs, à raison de 5 ml/kg/jour. En plus d'une stimulation locale, nous avons montré que le gavage à l'EPS exerce un effet systémique sur le SI. En effet, les splénocytes isolés de souris gavées avec l'EPS sécrètent moins d'IL-4, d'IL-10 et d'IFN-γ que les splénocytes isolés de souris gavées à l'eau, lorsqu'ils sont stimulés pendant 24 ou 48 heures en présence d'IL-2 (1,25 ng/ml) et de ConA (5 µg/ml). Nous proposons donc que l'EPS, en activant le SI inné de façon non spécifique par la production d'IL-12 et d'IL-18, favorise un profil de différenciation T_H1. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les splénocytes isolés de souris gavées à l'EPS sécrètent moins d'IL-4 et d'IL-10 que ceux isolés de souris gavées à l'eau. En effet, ces deux cytokines induisent la différenciation des lymphocytes CD4⁺ vers un profil T_H2 et elles sont de plus sécrétées par les cellules T_H2 différenciées. Étant donné que l'EPS ne fait qu'amorcer le processus de différenciation, il est normal que la production d'IFN-γ n'ait pas été augmentée, car c'est une cytokine sécrétée en situation inflammatoire par les cellules T_H1 différenciées. Les souris gavées sont des souris saines non infectées et donc, elles ne devraient pas sécréter de médiateurs de l'inflammation, à moins que l'EPS induise ce processus, ce qui ne semble pas être le cas. Cette affirmation a été confirmée par le fait que l'EPS ne stimule pas la transcription de l'IL-1, une cytokine pro-inflammatoire, lorsqu'il est ajouté au milieu de culture des RAW 264,7 à pendant 24 heures à une concentration finale de 1 ou 10 µg/ml.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont donc permis d'identifier plus précisément la nature de l'EPS produit par INIX. De plus, il a clairement été établi que cet EPS possède une action immunomodulatrice, dont les modalités d'action commencent à être définies. Effectivement, l'EPS pourrait initier la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ vers un profil T_H1. Toutefois, il reste encore des expériences complémentaires à faire pour

confirmer cette hypothèse, dont certaines sont présentées à la fin de la discussion. Dans le cas où ces expériences confirmeraient notre hypothèse, l'EPS d'INIX pourraient avoir de nombreuses applications pratiques dans différents domaines des industries alimentaires et pharmaceutiques. Somme toute, il est évident que l'EPS d'INIX possède un potentiel immunomodulateur intéressant.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Aderem, A. et R. J. Ulevitch (2000). "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response." Nature **406**(6797): 782-7.
- Aderem, A. et D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." Annu Rev Immunol **17**: 593-623.
- Allan, C. H. et J. S. Trier (1991). "Structure and permeability differ in subepithelial villus and Peyer's patch follicle capillaries." Gastroenterology **100**(5 Pt 1): 1172-9.
- Aragane, Y., A. Maeda, A. Schwarz, T. Tezuka, K. Ariizumi et T. Schwarz (2003). "Involvement of dectin-2 in ultraviolet radiation-induced tolerance." J Immunol **171**(7): 3801-7.
- Arihara, K., T. Toba et S. Adachi (1990). "Immunofluorescence microscopic studies on distribution of *Lactobacillus kefirianofaciens* and *Lactobacillus kefir* in kefir grains." Int J Food Microbiol **11**(2): 127-34.
- Ariizumi, K., G. L. Shen, S. Shikano, R. Ritter, P. Zukas, D. Edelbaum, A. Morita et A. Takashima (2000). "Cloning of a second dendritic cell-associated C-type lectin (dectin-2) and its alternatively spliced isoforms." J Biol Chem **275**(16): 11957-63.
- Ariizumi, K., G.L. Shen, S. Shikano, S. Xu, R. Ritter, T. Kumamoto, D. Edelbaum, A. Morita, P.R. Bergstresser et A. Takashima (2000). "Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning." J Biol Chem **275**(26): 20157-67.
- Arika, T., K. Amemiya et K. Nomoto (1992). "Combination therapy of radiation and Sizofiran (SPG) on the tumor growth and metastasis on squamous-cell carcinoma NR-S1 in syngeneic C3H/He mice." Biotherapy **4**(2): 165-70.
- Bjarnason, I., A. MacPherson et D. Hollander (1995). "Intestinal permeability: an overview." Gastroenterology **108**(5): 1566-81.
- Bleicher, P. et W. Mackin (1995). "Betafectin PGG-glucan: a novel carbohydrate immunomodulator with anti-infective properties." Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol **37**: 143-166.
- Bogdan, C., Y. Vodovotz et C. Nathan (1991). "Macrophage deactivation by interleukin 10." J Exp Med **174**(6): 1549-55.
- Bot, A., K. A. Smith et M. von Herrath (2004). "Molecular and cellular control of T1/T2 immunity at the interface between antimicrobial defense and immune pathology." DNA Cell Biol **23**(6): 341-50.
- Brialy, C., P. Rivalland, L. Coiffard et Y. De Roeck Holtzhauer (1995). "Microbiological study of lyophilized dairy kefir." Folia Microbiol (Praha) **40**(2): 198-200.
- Brown, G. D. et S. Gordon (2001). "Immune recognition. A new receptor for beta-glucans." Nature **413**(6851): 36-7.
- Carvalho, L. H., G. Sano, J.C. Hafalla, A. Morrot, M.A. Curotto de Lafaille et F. Zavala (2002). "IL-4-secreting CD4+ T cells are crucial to the development of CD8+ T-cell responses against malaria liver stages." Nat Med **8**(2): 166-70.
- Ceming, J. (1990). "Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria." FEMS Microbiol Rev **7**(1-2): 113-30.

- Cevikbas, A., E. Yemni, F.W. Ezzedenn, T. Yardimici, U. Cevikbas et S.J. Stohs (1994). "Antitumoural antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain." Phytotherapy Research **8**: 78-82.
- Chabot, S., H.-L. Yu, L. De Léséleuc, D. Clourier, M.-R. Van Calsteren, M. Lessard, D. Roy, M. Lacroix et D. Oth (2001). "Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN-gamma in mouse splenocytes." Lait **81**: 683-697.
- Chang, J. T., B. M. Segal, K. Nakanishi, H. Okamura et E.M. Shevach (2000). "The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigen-specific IFN-gamma production by resting T cells is IL-12 dependent and is mediated by up-regulation of the IL-12 receptor beta2 subunit." Eur J Immunol **30**(4): 1113-9.
- Chehade, M. et L. Mayer (2005). "Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities." J Allergy Clin Immunol **115**(1): 3-12; quiz 13.
- Cheirsilp, B., H. Shimizu et S. Shioya (2001). "Modelling and optimization of environmental conditions for kefir production by *Lactobacillus kefirifaciens*." Appl Microbiol Biotechnol **57**(5-6): 639-46.
- Cheirsilp, B., H. Shimizu et S. Shioya (2003). "Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*." J Biotechnol **100**(1): 43-53.
- Chen, H.L., D.F. Li, B.Y. Chang, L.M. Gong, J.G. Dai et G.F. Yi (2003). "Effects of Chinese Herbal Polysaccharides on the Immunity and Growth Performance of Young Broilers" Poult Sci **82**:364-70.
- Cheung, N. K. et S. Modak (2002). "Oral (1->3),(1->4)-beta-D-glucan synergizes with antiganglioside GD2 monoclonal antibody 3F8 in the therapy of neuroblastoma." Clin Cancer Res **8**(5): 1217-23.
- Cheung, N. K., S. Modak, A. Vickers et B. Knuckles (2002). "Orally administered beta-glucans enhance anti-tumor effects of monoclonal antibodies." Cancer Immunol Immunother **51**(10): 557-64.
- Choi, I. S. et Y. I. Koh (2002). "Therapeutic effects of BCG vaccination in adult asthmatic patients: a randomized, controlled trial." Ann Allergy Asthma Immunol **88**(6): 584-91.
- Choi, I. S. et I. Koh (2003). "Effects of BCG revaccination on asthma." Allergy **58**(11): 1114-6.
- Cua, D. J., J. Sherlock, Y. Chen, C.A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S.A. Lira, D. Gorman, R.A. Kastelein et J.D. Sedgwick (2003). "Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain." Nature **421**(6924): 744-8.
- Dabbagh, K. et D. B. Lewis (2003). "Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses." Curr Opin Infect Dis **16**(3): 199-204.
- Davis, J. M., E. A. Murphy, A.S. Brown, M.D. Carmichael, A. Ghaffar et E.P Mayer (2004). "Effects of moderate exercise and oat beta-glucan on innate immune function and susceptibility to respiratory infection." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **286**(2): R366-72.

- De Vuyst, L. et B. Degeest (1999). "Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria." FEMS Microbiol Rev **23**(2): 153-77.
- de Waal Malefyt, R., H. Yssel et J.E. de Vries (1993). "Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation." J Immunol **150**(11): 4754-65.
- Delayre-Orthez, C., F. de Blay, N. Frossard et F. Pons (2004). "Dose-dependent effects of endotoxins on allergen sensitization and challenge in the mouse." Clin Exp Allergy **34**(11): 1789-95.
- Dickensheets, H. L., C. Venkataraman, U. Schindler et R.P. Donnelly (1999). "Interferons inhibit activation of STAT6 by interleukin 4 in human monocytes by inducing SOCS-1 gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(19): 10800-5.
- Diefenbach, A., H. Schindler, M. Rollinghoff, W.M. Yokoyama et C. Bogdan (1999). "Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity." Science **284**(5416): 951-5.
- Dinarello, C. A. (1996). "Biologic basis for interleukin-1 in disease." Blood **87**(6): 2095-147.
- Dinarello, C. A. (2000). "Proinflammatory cytokines." Chest **118**(2): 503-8.
- Diniz, R. O., L. K. Garla, J.M. Schneedorf et J.C. Carvalho (2003). "Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix." Pharmacol Res **47**(1): 49-52.
- Doita, M., L. T. Rasmussen, R. Seljelid et P.E. Lipsky (1991). "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 **49**(4): 342-51.
- Duan, C.L., S.Y. Qiao, N.L. Wang, Y.M. Zhao, C.H. Qi, et X.S. Yao (2001). "Studies on the active polysaccharides from *Lycium barbarum* L." Yao Xue Xue Bao **36** (3): 196-9.
- East, L. et C. M. Isacke (2002). "The mannose receptor family." Biochim Biophys Acta **1572**(2-3): 364-86.
- Ehlers, M. R. (2000). "CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity." Microbes Infect **2**(3): 289-94.
- Eskdale, J., J. McNicholl, P. Wordsworth, B. Jonas, T. Huizinga, M. Field et G. Gallagher (1998). "Interleukin-10 microsatellite polymorphisms and IL-10 locus alleles in rheumatoid arthritis susceptibility." Lancet **352**(9136): 1282-3.
- Fantuzzi, G., D.A. Reed et C.A. Dinarello (1999). "IL-12-induced IFN-gamma is dependent on caspase-1 processing of the IL-18 precursor." J Clin Invest **104**(6): 761-7.
- Ferlazzo, G., M. Pack, T. Dolca, C. Paludan et D. Schmid (2004). "Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(47): 16606-11.
- Fields, P. E., S. T. Kim et R.A. Flavell (2002). "Cutting edge: changes in histone acetylation at the IL-4 and IFN-gamma loci accompany Th1/Th2 differentiation." J Immunol **169**(2): 647-50.
- Fiete, D. J., M. C. Beranek et J.U. Baenziger (1998). "A cysteine-rich domain of the "mannose" receptor mediates GalNAc-4-SO4 binding." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2089-93.

- Finkelman, F. D. et J. F. Urban Jr. (2001). "The other side of the coin: the protective role of the TH2 cytokines." J Allergy Clin Immunol **107**(5): 772-80.
- Frengova, G. I., E. D. Simova, D.M. Beshkova et Z.I. Simov (2002). "Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains." Z Naturforsch [C] **57**(9-10): 805-10.
- Fujimoto, S., H. Furue, T. Kimura, T. Kondo, K. Orita, T. Taguchi, K. Yoshida et N. Ogawa (1991). "Clinical outcome of postoperative adjuvant immunochemotherapy with sizofiran for patients with resectable gastric cancer: a randomised controlled study." Eur J Cancer **27**(9): 1114-8.
- Fujisawa, T., S. Adachi, T. Toba, K. Arihara et T. Mitsuoka (1988). "Lactobacillus kefirianofaciens sp. nov. isolated from kefir grains." Int J Syst Bacteriol, **38**: 12-14.
- Furukawa, N., R. Iiyama, T. Takahashi et Y. Yamanaka (1992). "Effect of oral administration of water soluble fraction from kefir grain on antibody production in mice." Animal Science and Technology (Japan) **63**: 428-436.
- Furukawa, N., A. Matsuoka, T. Takahashi et Y. Yamanaka (2000). "Anti-metastatic effect of kefir grain components on Lewis lung carcinoma and highly metastatic B16 melanoma mice." Journal of Agriculture Science Tokyo Nogyo Daigaku **45**: 62-70.
- Furukawa, N., T. Takahashi et Y. Yamanaka (1996). "Effects of supernatant of Peyer's Patch cell culture with kefir grain components on the mitogenic response of thymocyte and splenocyte in mice." Animal Science and Technology (Japan) **67**: 153-159.
- Furukawa, N., Y. Yokokawa, T. Takahashi et Y. Yamanaka (1993). "Effects of oral administration of water soluble fraction from kefir grains on glucose consumption and phagocytosis of peritoneal exudate cells in mice." Animal Science and Technology (Japan) **64**: 60-67.
- Furutani, Y., M. Notake, T. Fukui, M. Ohue, H. Nomura, M. Yamada et S. Nakamura (1986). "Complete nucleotide sequence of the gene for human interleukin 1 alpha." Nucleic Acids Res **14**(8): 3167-79.
- Garcia-Garcia, E. et C. Rosales (2002). "Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis." J Leukoc Biol **72**(6): 1092-108.
- Garrote, G. L., A. G. Abraham et G.L. De Antoni (2000). "Inhibitory power of kefir: the role of organic acids." J Food Prot **63**(3): 364-9.
- Gately, M. K., L. M. Renzetti, J. Magram, A.S. Stern, L. Adorini, U. Gubler et D.H. Presky (1998). "The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses." Annu Rev Immunol **16**: 495-521.
- Giannasca, P. J., K. T. Giannasca, P. Falk, J.I. Gordon et M.R. Neutra (1994). "Regional differences in glycoconjugates of intestinal M cells in mice: potential targets for mucosal vaccines." Am J Physiol **267**(6 Pt 1): G1108-21.
- Gibson, G. R. (1998). "Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics." Br J Nutr **80**(4): S209-12.
- Gibson, G. R., E. R. Beatty, X. Wang et J.H. Cummings (1995). "Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin." Gastroenterology **108**(4): 975-82.
- Gill, H. S. (1998). "Stimulation of the immune system by lactic cultures." International DairyJournal **8**: 535-44.

- Giri, J. G., P. T. Lomedico et S.B. Mizel (1985). "Studies on the synthesis and secretion of interleukin 1. I. A 33,000 molecular weight precursor for interleukin 1." J Immunol **134**(1): 343-9.
- Guven, A. et M. Gulmez (2003). "The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **50**(8): 412-6.
- Hart, S. P., J. R. Smith et I. Dransfield (2004). "Phagocytosis of opsonized apoptotic cells: roles for 'old-fashioned' receptors for antibody and complement." Clin Exp Immunol **135**(2): 181-5.
- He, F., H. Morita, C. Ouwehand Arthur, M. Hosoda, M. Hiramatsu, J.I. Kurisaki, E. Isolauri, Y. Benno et S. Salminen (2002). "Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by Bifidobacterium Strains." Microbiol Immunol **46**: 781-785.
- He, Y. L., Y. Ying, Y.L. Xu, J.F. Su, H. Luo et H.F. Wang (2005). "[Effects of Lycium barbarum polysaccharide on tumor microenvironment T-lymphocyte subsets and dendritic cells in H22-bearing mice]." Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao **3**(5): 374-7.
- Hein, W. R. (1999). "Organization of mucosal lymphoid tissue." Curr Top Microbiol Immunol **236**: 1-15.
- Hosono, A., T. Tanabe et H. Otani (1990). "Binding properties of lactic acid bacteria isolated from kefir milk with mutagenic amino acid pyrolyzates." Milchwissenschaft **45**: 647-651.
- Howard, M., A. O'Garra, H. Ishida, R. de Waal Malefyt et J. de Vries (1992). "Biological properties of interleukin 10." J Clin Immunol **12**(4): 239-47.
- Inoue, A., N. Kodama et H. Nanba (2002). "Effect of maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the control of the T lymph node Th-1/Th-2 proportion." Biol Pharm Bull **25**(4): 536-40.
- Iwasaki, A. et B. L. Kelsall (2000). "Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine." J Exp Med **191**(8): 1381-94.
- Jamuna, M. et K. Jeevaratnam (2004). "Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins." J Gen Appl Microbiol **50**(2): 79-90.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54 Pt 1**: 1-13.
- Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport et M.J. Shlomchik (2001). Immunobiologie. Paris, De Boeck Université.
- Jankovic, D., Z. Liu et W.C. Gause (2001). "Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways." Trends Immunol **22**(8): 450-7.
- Jolly, L., S. J. Vincent, P. Duboc, J.R. Neeser (2002). "Exploiting expolysaccharides from lactic acid bacteria." Antonie Van Leeuwenhoek **82**(1-4): 367-74.

- Kakumu, S., T. Ishikawa, T. Wakita, K. Yoshioka, Y. Ito et T. Shinagawa (1991). "Effect of sizofiran, a polysaccharide, on interferon gamma, antibody production and lymphocyte proliferation specific for hepatitis B virus antigen in patients with chronic hepatitis B." Int J Immunopharmacol **13**(7): 969-75.
- Karulin, A. Y., M. D. Hesse, H.C. Yip et P.V. Lehmann (2002). "Indirect IL-4 pathway in type 1 immunity." J Immunol **168**(2): 545-53.
- Kelly-Welch, A., E. M. Hanson et A.D. Keegan (2005). "Interleukin-4 (IL-4) pathway." Sci STKE **2005**(293): cm9.
- Kelly-Welch, A. E., E. M. Hanson, (2003). "Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps." Science **300**(5625): 1527-8.
- Kelsall, B., F. Leon, M.R. Boothby et A.D. Keegan (2005). "Antigen handling and presentation by mucosal dendritic cells and macrophages" Elsevier Academic Press.
- Kelsall, B. L. et W. Strober (1996). "Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch." J Exp Med **183**(1): 237-47.
- Kett, K., K. Baklien, A. Bakken, J.G. Kral, O. Fausa et P. Brandtzaeg (1995). "Intestinal B-cell isotype response in relation to local bacterial load: evidence for immunoglobulin A subclass adaptation." Gastroenterology **109**(3): 819-25.
- Kim, J. M., C. I. Brannan, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, T.A. Khan et K.W. Moore (1992). "Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes." J Immunol **148**(11): 3618-23.
- Kimmel, S.A. et R.F. Roberts (1998) Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. Int J Food Microbiol **40**: 87-92.
- Kitazawa, H., Y. Tomioka, K. Matsumura, H. Aso, M. Mizugaki, T. Itoh et T. Yamaguchi (1994). "Expression of mRNA encoding IFN alpha in macrophages stimulated with *Lactobacillus gasseri*." FEMS Microbiol Lett **120**(3): 315-21.
- Koch, S. D., J. Kempf et G. Pawelec (2005). "T Cell Immunity and Aging." Sci Aging Knowledge Environ **2005**(48): pe37.
- Kohno, K., J. Kataoka, T. Ohtsuki, Y. Suemoto, I. Okamoto, M. Usui, M. Ikeda et M. Kurimoto (1997). "IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12." J Immunol **158**(4): 1541-50.
- Kuroda, E., T. Kito et U. Yamashita (2002). "Reduced expression of STAT4 and IFN-gamma in macrophages from BALB/c mice." J Immunol **168**(11): 5477-82.
- La Riviere, J. W. et P. Kooiman (1967). "Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*." Arch Mikrobiol **59**(1): 269-78.
- Lalani, I., K. Bhol et A.R. Ahmed (1997). "Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity." Ann Allergy Asthma Immunol **79**(6): 469-83.
- Lamothe, G. T., L. Jolly, B. Mollet et F. Stinglele (2002). "Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*." Arch Microbiol **178**(3): 218-28.
- Lawless, V. A., S. Zhang, O.N. Ozes, H.A. Bruns, I. Oldham, T. Hoey, M.J. Grusby et M.H. Kaplan (2000). "Stat4 regulates multiple components of IFN-gamma-inducing signaling pathways." J Immunol **165**(12): 6803-8.

- Le Blay, G., C. Michel, H.M. Blottiere et C.J. Cherbut (1999). "Enhancement of butyrate production in the rat caecocolonic tract by long-term ingestion of resistant potato starch." *Br J Nutr* **82**(5): 419-26.
- Le Blay, G. M., C. D. Michel, H.M. Blottiere et C.J. Cherbut (2003). "Raw potato starch and short-chain fructo-oligosaccharides affect the composition and metabolic activity of rat intestinal microbiota differently depending on the caecocolonic segment involved." *J Appl Microbiol* **94**(2): 312-20.
- Leitenberg, D. et K. Bottomly (1999). "Regulation of naive T cell differentiation by varying the potency of TCR signal transduction." *Semin Immunol* **11**(4): 283-92.
- Li, L., G. Meng, M.F. Graham, G.M. Shaw et P.D. Smith (1999). "Intestinal macrophages display reduced permissiveness to human immunodeficiency virus 1 and decreased surface CCR5." *Gastroenterology* **116**(5): 1043-53.
- Li, W., T. Yajima, K. Saito, H. Nishimura, T. Fushimi, Y. Ohshima, Y. Tsukamoto et Y. Yoshikai (2004). "Immunostimulating properties of intragastrically administered Acetobacter-derived soluble branched (1,4)-beta-D-glucans decrease murine susceptibility to *Listeria monocytogenes*." *Infect Immun* **72**(12): 7005-11.
- Liew, F. Y. (1993). "The role of nitric oxide in parasitic diseases." *Ann Trop Med Parasitol* **87**(6): 637-42.
- Liu, J. R., S. Y. Wang, Y.Y. Lin et C.W. Lin (2002). "Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice." *Nutr Cancer* **44**(2): 183-7.
- Loher, F., C. Bauer, N. Landauer, K. Schmall, B. Siegmund, H.A. Lehr, M. Dauer, M. Schoenharting, S. Endres et A. Eigler (2004). "The interleukin-1 beta-converting enzyme inhibitor palnacasen reduces dextran sulfate sodium-induced murine colitis and T helper 1 T-cell activation." *J Pharmacol Exp Ther* **308**(2): 583-90.
- Looijesteijn, P. J., L. Trapet, E. de Vries, T. Abee et J. Hugenholtz (2001). "Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*." *Int J Food Microbiol* **28**(64): 71-80.
- Lucey, D. R., M. Clerici et G.M. Shearer (1996). "Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases." *Clin Microbiol Rev* **9**(4): 532-62.
- Maeda, H., X. Zhu, S. Suzuki, K. Suzuki et S. Kitamura (2004). "Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B(T)." *J Agric Food Chem* **52**(17): 5533-8.
- Man, A. L., M. E. Prieto-Garcia et C. Nicoletti (2004). "Improving M cell mediated transport across mucosal barriers: do certain bacteria hold the keys?" *Immunology* **113**(1): 15-22.
- Maury, J., C. Nicoletti, L. Guzzo-Chambrud et S. Maroux (1995). "The filamentous brush border glycocalyx, a mucin-like marker of enterocyte hyper-polarization." *Eur J Biochem* **228**(2): 323-31.
- McGreal, E. P., L. Martinez-Pomares et S. Gordon (2004). "Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system." *Mol Immunol* **41**(11): 1109-21.
- McGreal, E. P., J. L. Miller et S. Gordon (2005). "Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors." *Curr Opin Immunol* **17**(1): 18-24.

- McInnes, I. B., J. A. Gracie, B.P. Leung, X.Q. Wei et F.Y. Liew (2000). "Interleukin 18: a pleiotropic participant in chronic inflammation." Immunol Today 21(7): 312-5.
- Means, T. K., D. T. Golenbock et M.J. Fenton (2000). "The biology of Toll-like receptors." Cytokine Growth Factor Rev 11(3): 219-32.
- Meng, G., M. T. Sellers, M. Mosteller-Barnum, T.S. Rogers, G.M. Shaw et P.D. Smith (2000). "Lamina propria lymphocytes, not macrophages, express CCR5 and CXCR4 and are the likely target cell for human immunodeficiency virus type 1 in the intestinal mucosa." J Infect Dis 182(3): 785-91.
- Meng, X., D. Sawamura, K. Tamai, K. Hanada, H. Ishida et I. Hashimoto (1998). "Keratinocyte gene therapy for systemic diseases. Circulating interleukin 10 released from gene-transferred keratinocytes inhibits contact hypersensitivity at distant areas of the skin." J Clin Invest 101(6): 1462-7.
- Messens, W. et V. L. De (2002). "Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs--a review." Int J Food Microbiol 72(1-2): 31-43.
- Messi, M., I. Giacchetto, K. Nagata, A. Lanzavecchia, G. Natoli et F. Sallusto (2003). "Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes." Nat Immunol 4(1): 78-86.
- Micheli, L., D. Uccelletti, C. Palleschi et V. Crescenzi (1999). "Isolation and characterisation of a ropy Lactobacillus strain producing the exopolysaccharide kefiran." Appl Microbiol Biotechnol 53(1): 69-74.
- Miura, M., H. Zhu, R. Rotello, E.A. Hartweg et J. Yuan (1993). "Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*." Cell 75(4): 653-60.
- Miyamoto, T., H. Morita, K. Nishioka, K. Kataoka, M. Izumimoto et T. Kuyama (1991). "Constituent species of lactic acid bacteria from kefir and their desmutagenic properties." Japanese Journal of Dairy and Food Science 40: 111-112.
- Miyazaki, K., H. Mizutani, H. Katabuchi, K. Fukuma, S. Fujisaki et H. Okamura (1995). "Activated (HLA-DR+) T-lymphocyte subsets in cervical carcinoma and effects of radiotherapy and immunotherapy with sizofiran on cell-mediated immunity and survival." Gynecol Oncol 56(3): 412-20.
- Modak, S., G. Koehne, A. Vickers, R.J. O'Reilly et N.K. Cheung (2005). "Rituximab therapy of lymphoma is enhanced by orally administered (1-->3),(1-->4)-D-beta-glucan." Leuk Res 29(6): 679-83.
- Morita, H., F. He, T. Fuse, A.C. Ouwehand, H. Hashimoto, M. Hosoda, K. Mizumachi et J. Kurisaki (2002). "Cytokine production by the murine macrophage cell line J774.1 after exposure to lactobacilli." Biosci Biotechnol Biochem 66(9): 1963-6.
- Mukai, T., T. Toba, T. Itoh, T. Nimura et S. Adachi (1990). "Carboxymethyl kefiran: preparation and viscometric properties." Journal of Food Science 55: 1483-1484.
- Mullen, A. C., F. A. High, A.S. Hutchins, H.W. Lee, A.V. Villarino, D.M. Livingston, A.L. Kung, N. Cereb, T.P. Yao, S.Y. Yang et S.L. Reiner (2001). "Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection." Science 292(5523): 1907-10.

- Murofushi, M., J. Mizuguchi, K. Aibara et T. Matuhasi (1986). "Immunopotentiative effect of polysaccharide from kefir grain, KGF-C, administered orally in mice." Immunopharmacology **12**(1): 29-35.
- Murofushi, M., M. Shiomi et K. Aibara (1983). "Effect of orally administered polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice." Jpn J Med Sci Biol **36**(1): 49-53.
- Murphy, K. M., W. Ouyang, J.D. Farrar, J. Yang, S. Ranganath, H. Asnagli, M. Afkarian et T.L. Murphy (2000). "Signaling and transcription in T helper development." Annu Rev Immunol **18**: 451-94.
- Nakajima, H., T. Toba et S. Toyoda (1995). "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 **25**(2): 153-8.
- Nakano, T., K. Oka, K. Hanba et S. Morita (1996). "Intratumoral administration of sizofiran activates Langerhans cell and T-cell infiltration in cervical cancer." Clin Immunol Immunopathol **79**(1): 79-86.
- Nelms, K., H. Huang, J. Ryan, A. Keegan et W.E. Paul (1998). "Interleukin-4 receptor signalling mechanisms and their biological significance." Adv Exp Med Biol **452**: 37-43.
- Neutra, M. R. (1998). "Current concepts in mucosal immunity. V Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system." Am J Physiol **274**(5 Pt 1): G785-91.
- Neutra, M. R., N. J. Mantis et J.P. Kraehenbuhl (2001). "Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues." Nat Immunol **2**(11): 1004-9.
- Neutra, M. R., E. Pringault et J.P. Kraehenbuhl (1996). "Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses." Annu Rev Immunol **14**: 275-300.
- Nishikomori, R., R. O. Ehrhardt et W. Strober (2000). "T helper type 2 cell differentiation occurs in the presence of interleukin 12 receptor beta2 chain expression and signaling." J Exp Med **191**(5): 847-58.
- Noble, A., M. J. Thomas et D.M. Kemeny (2001). "Early Th1/Th2 cell polarization in the absence of IL-4 and IL-12: T cell receptor signaling regulates the response to cytokines in CD4 and CD8 T cells." Eur J Immunol **31**(7): 2227-35.
- Okamura, H., H. Tsutsi, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Hattori et al. (1995). "Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells." Nature **378**(6552): 88-91.
- Owen, R. L. et D. K. Bhalla (1983). "Cytochemical analysis of alkaline phosphatase and esterase activities and of lectin-binding and anionic sites in rat and mouse Peyer's patch M cells." Am J Anat **168**(2): 199-212.
- Pabst, O., H. Herbrand, G. Bernhardt et R. Forster (2004). "Elucidating the functional anatomy of secondary lymphoid organs." Curr Opin Immunol **16**(4): 394-9.
- Pesu, M., L. Muul, Y. Kanno et J.J. O'Shea (2006). "Proprotein convertase furin is preferentially expressed in T helper 1 cells and regulates interferon- γ ." Blood **108**(3):983-5.

- Pham, P. L., I. Dupont, D. Roy, G. Lapointe et J. Cerning (2000). "Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation." *Appl Environ Microbiol* **66**(6): 2302-10.
- Poncet, P., M. Arock et B. David (1999). "MHC class II-dependent activation of CD4+ T cell hybridomas by human mast cells through superantigen presentation." *J Leukoc Biol* **66**(1): 105-12.
- Ramamoorthy, L., M. C. Kemp et I.R. Tizard (1996). "Acemannan, a beta-(1,4)-acetylated mannan, induces nitric oxide production in macrophage cell line RAW 264.7." *Mol Pharmacol* **50**(4): 878-84.
- Regoli, M., E. Bertelli, C. Borghesi et C. Nicoletti (1995). "Three-dimensional (3D-) reconstruction of M cells in rabbit Peyer's patches: definition of the intraepithelial compartment of the follicle-associated epithelium." *Anat Rec* **243**(1): 19-26.
- Rengarajan, J., S. J. Szabo et L.H. Glimcher (2000). "Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization." *Immunol Today* **21**(10): 479-83.
- Rescigno, M., G. Rotta, B. Valzasina et P. Ricciardi-Castagnoli (2001). "Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers." *Immunobiology* **204**(5): 572-81.
- Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J.P. Kraehenbuhl et P. Ricciardi-Castagnoli (2001). "Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria." *Nat Immunol* **2**(4): 361-7.
- Rimada, P. S. et A. G. Abraham (2001). "Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation." *J Dairy Res* **68**(4): 653-61.
- Roberfroid, M. B. (2005). "Introducing inulin-type fructans." *Br J Nutr* **93 Suppl 1**: S13-25.
- Rodrigues, K. L., L. R. Caputo, J.C. Carvalho, J. Evangelista et J.M. Schneedorf (2005). "Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract." *Int J Antimicrob Agents* **25**(5): 404-8.
- Rodrigues, K. L., J. C. Carvalho et J.M. Schneedorf (2005). "Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract." *Inflammopharmacology* **13**(5-6): 485-92.
- Romagnani, S. (2000). "The role of lymphocytes in allergic disease." *J Allergy Clin Immunol* **105**(3): 399-408.
- Romagnani, S. (2004). "Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance." *J Allergy Clin Immunol* **113**(3): 395-400.
- Ross, G. D. (2000). "Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/alphaMbeta2-integrin glycoprotein." *Crit Rev Immunol* **20**(3): 197-222.
- Roux, M. E., M. McWilliams, et al. (1981). "Differentiation pathway of Peyer's patch precursors of IgA plasma cells in the secretory immune system." *Cell Immunol* **61**(1): 141-53.
- Ruedl, C. et S. Hubele (1997). "Maturation of Peyer's patch dendritic cells in vitro upon stimulation via cytokines or CD40 triggering." *Eur J Immunol* **27**(6): 1325-30.
- Ruiz-Bravo, A., M. Jimenez-Valera, E. Moreno, V. Guerra et A. Ramos-Cormenzana (2001). "Biological response modifier activity of an exopolysaccharide from *Paenibacillus jamilae* CP-7." *Clin Diagn Lab Immunol* **8**(4): 706-10.

- Sakagami, Y., Y. Mizoguchi, T. Shin, S. Seki, K. Kobayashi, S. Morisawa et S. Yamamoto (1988). "Effects of an anti-tumor polysaccharide, schizophyllan, on interferon-gamma and interleukin 2 production by peripheral blood mononuclear cells." Biochem Biophys Res Commun **155**(2): 650-5.
- Sakurai, T., T. Kaise, T. Yadomae et C. Matsubara (1997). "Different role of serum components and cytokines on alveolar macrophage activation by soluble fungal (1->3)-beta-D-glucan." Eur J Pharmacol **334**(2-3): 255-63.
- Salminen, S., C. Bouley, M.C. Boutron-Ruault, J.H. Cummings, A. Franck, G.R. Gibson, E. Isolauri, M.C. Moreau, M. Roberfroid et I. Rowland (1998). "Functional food science and gastrointestinal physiology and function." Br J Nutr **80** Suppl 1: S147-71.
- Sander, M. E. (1993). "Summary of conclusions from a consensus panel of experts on health attributes of lactic cultures: significance to fluid milk products containing cultures." J Dairy Sci **76**(7): 1819-28.
- Santos, A., M. San Mauro, A. Sanchez, J.M. Torres et D. Marquina (2003). "The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir." Syst Appl Microbiol **26**(3): 434-7.
- Schaeffer, E. M., G. S. Yap, C.M. Lewis, M.J. Czar, D.W. McVicar, A. Cheever, A. Sher et P.L. Schwartzberg (2001). "Mutation of Tec family kinases alters T helper cell differentiation." Nat Immunol **2**(12): 1183-8.
- Semenza, G. (1986). "Anchoring and biosynthesis of stalked brush border membrane proteins: glycosidases and peptidases of enterocytes and renal tubuli." Annu Rev Cell Biol **2**: 255-313.
- Serot, T., X. Dousset, J. Zucca et N. Torcatis (1990). "Mise en évidence et purification partielle de substances antibactériennes produites par *Leuconostoc mesenteroides* et *Lactobacillus plantarum* isolés de grains de kéfir." Microbiologie Aliments Nutrition **8**: 71-76.
- Shepherd, V. L. et J. R. Hoidal (1990). "Clearance of neutrophil-derived myeloperoxidase by the macrophage mannose receptor." Am J Respir Cell Mol Biol **2**(4): 335-40.
- Sher, A., D. Fiorentino, P. Caspar, E. Pearce et T. Mosmann (1991). "Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection." J Immunol **147**(8): 2713-6.
- Shiomi, M., K. Sasaki, M. Murofushi et K. Aibara (1982). "Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from Kefir grain." Jpn J Med Sci Biol **35**(2): 75-80.
- Shreedhar, V. K., B. L. Kelsall et M.R. Neutra (2003). "Cholera toxin induces migration of dendritic cells from the subepithelial dome region to T- and B-cell areas of Peyer's patches." Infect Immun **71**(1): 504-9.
- Sicinski, P., J. Rowinski, J.B. Warchol, Z. Jarzabek, W. Gut, B. Szczygiel, K. Bielecki et G. Koch (1990). "Poliovirus type 1 enters the human host through intestinal M cells." Gastroenterology **98**(1): 56-8.
- Simova, E., D. Beshkova, A. Angelov, T.S. Hristozova, G. Frengova, G et Z. Spasov (2002). "Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them." J Ind Microbiol Biotechnol **28**(1): 1-6.
- Sims, J. E. (2002). "IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family." Curr Opin Immunol **14**(1): 117-22.

- Sinha, V. R. et R. Kumria (2001). "Polysaccharides in colon-specific drug delivery." Int J Pharm **224**(1-2): 19-38.
- Smedsrod, B., M. Einarsson et H. Pertoft (1988). "Tissue plasminogen activator is endocytosed by mannose and galactose receptors of rat liver cells." Thromb Haemost **59**(3): 480-4.
- Smeltz, R. B., J. Chen, J. Hu-Li et E.M. Shevach (2001). "Regulation of interleukin (IL)-18 receptor alpha chain expression on CD4(+) T cells during T helper (Th)1/Th2 differentiation. Critical downregulatory role of IL-4." J Exp Med **194**(2): 143-53.
- Smith, P. D., C. Ochsenbauer-Jambor et L.E. Smythies (2005). "Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system." Immunol Rev **206**: 149-59.
- Smith, P. D., L. E. Smythies, M. Mosteller-Barnum, D.A. Sibley, M.W. Russell, M. Merger, M.T. Sellers, J.M. Orenstein, T. Shimada, M.F. Graham et H. Kubagawa (2001). "Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities." J Immunol **167**(5): 2651-6.
- Smythies, L. E., M. Sellers, R.H. Clements, M. Mosteller-Barnum, G. Meng, W.H. Benjamin, J.M. Orenstein et P.D. Smith (2005). "Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity." J Clin Invest **115**(1): 66-75.
- Spilianakis, C. G., M. D. Lalioti, T. Town, G.R. Lee et R.A. Flavell (2005). "Interchromosomal associations between alternatively expressed loci." Nature **435**(7042): 637-45.
- Stahl, P. D., J. S. Rodman, M.J. Miller et P.H. Schlesinger (1978). "Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(3): 1399-403.
- Stoll, S., G. Muller, M. Kurimoto, J. Saloga, T. Tanimoto, H. Yamauchi, H. Okamura, J. Knop et A.H. Enk (1997). "Production of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes." J Immunol **159**(1): 298-302.
- Sugawara, S., A. Uehara, T. Nochi, T. Yamaguchi, H. Ueda, A. Sugiyama, K. Hanzawa, K. Kumagai, H. Okamura et H. Takada (2001). "Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells." J Immunol **167**(11): 6568-75.
- Sugimoto, K., M. Ohata, J. Miyoshi, H. Ishizaki, N. Tsuboi, A. Masuda, Y. Yoshikai, M. Takamoto, K. Sugane, S. Matsuo, Y. Shimada et T. Matsuguchi (2004). "A serine/threonine kinase, Cot/Tpl2, modulates bacterial DNA-induced IL-12 production and Th cell differentiation." J Clin Invest **114**(6): 857-66.
- Sutherland, I. W. (1998). "Novel and established applications of microbial polysaccharides." Trends Biotechnol **16**(1): 41-6.
- Szabo, S. J., B. M. Sullivan, C. Stemmann, A.R. Satoskar, B.P. Sleckman et L.H. Glimcher (2002). "Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells." Science **295**(5553): 338-42.
- Takeda, K., T. Kaisho et S. Akira (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-76.

- Tamir, A., W. J. Jordan, M. Ritter, N. Habib, R.I. Lechler, G.R. Foster et G. Lombardi (2005). "Interferon-alpha2a is sufficient for promoting dendritic cell immunogenicity." *Clin Exp Immunol* **142**(3): 471-80.
- Taylor, P. R., L. Martinez-Pomares, M. Stacey, H.H. Lin, G.D. Brown et S. Gordon (2005). "Macrophage receptors and immune recognition." *Annu Rev Immunol* **23**: 901-44.
- Thoreux, K. et D. L. Schmucker (2001). "Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rats." *J Nutr* **131**(3): 807-12.
- Topping, D. L. et R. J. Illman (1986). "Bacterial fermentation in the human large bowel. Time to change from the roughage model of dietary fibre?" *Med J Aust* **144**(6): 307-9.
- Townsend, M. J. et A. N. McKenzie (2000). "Unravelling the net ? cytokines and diseases." *J Cell Sci* **113** (Pt 20): 3549-50.
- Tzianabos, A. O. (2000). "Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function." *Clin Microbiol Rev* **13**(4): 523-33.
- Vales-Gomez, M., H. Reyburn et J. Strominger (2000). "Molecular analyses of the interactions between human NK receptors and their HLA ligands." *Hum Immunol* **61**(1): 28-38.
- Valladeau, J., O. Ravel, C. Dezutter-Dambuyant, K. Moore, M. Kleijmeer, Y. Liu, V. Duvert-Frances, C. Vincent, D. Schmitt, J. Davoust, C. Caux, S. Lebecque et S. Saeland (2000). "Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules." *Immunity* **12**(1): 71-81.
- Van Calsteren, M. R., C. Pau-Roblot, A. Begin et D. Roy (2002). "Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and R." *Biochem J* **363**(Pt 1): 7-17.
- Vetvicka, V., B. P. Thornton et G.D. Ross (1996). "Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells." *J Clin Invest* **98**(1): 50-61.
- Vinderola, C. G., J. Duarte, D. Thangavel, G. Perdigon, E. Farnworth et C. Matar (2005). "Immunomodulating capacity of kefir." *J Dairy Res* **72**(2): 195-202.
- Walker, W. A. et K. J. Isselbacher (1974). "Uptake and transport of macromolecules by the intestine. Possible role in clinical disorders." *Gastroenterology* **67**: 531-550.
- Wang, X., D. M. Hone, A. Haddad, M.T. Shata et D.W. Pascual (2003). "M cell DNA vaccination for CTL immunity to HIV." *J Immunol* **171**(9): 4717-25.
- Wang, Y., S. P. Li, S.A. Moser, K.L. Bost et J.E. Damer (1998). "Cytokine involvement in immunomodulatory activity affected by *Candida albicans* mannan." *Infect Immun* **66**(4): 1384-91.
- Wasser, S. P. (2002). "Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides." *Appl Microbiol Biotechnol* **60**(3): 258-74.
- Wehinger, J., F. Gouilleux, B. Groner, J. Finke, R. Mertelsmann et R.M. Weber-Nordt (1996). "IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes." *FEBS Lett* **394**(3): 365-70.

- Weis, W. I., G. V. Crichlow, H.M. Murthy, W.A. Hendrickson et K. Drickamer (1991). "Physical characterization and crystallization of the carbohydrate-recognition domain of a mannose-binding protein from rat." J Biol Chem **266**(31): 20678-86.
- Werman, A., R. Werman-Venkert, R. White, J.K. Lee, B. Werman, Y. Krelin, E. Voronov, C.A. Dinarello et R.N. Apte (2004). "The precursor form of IL-1alpha is an intracrine proinflammatory activator of transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2434-9.
- Williams, D. L., A. Mueller et W. Browder (1998). "Glucan-based macrophage stimulators: a review of their anti-infective potential." Clin. Immunother **5**: 392-399.
- Wolf, S. F., P. A. Temple, M. Kobayashi, D. Young, M. Dicig, L. Lowe, R. Dzialo, L. Fitz, C. Ferenz, R.M. Hewick, et al. (1991). "Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells." J Immunol **146**(9): 3074-81.
- Wu, C., X. Wang, M. Gadina, J.J. O'Shea, D.H. Presky et J. Magram (2000). "IL-12 receptor beta 2 (IL-12R beta 2)-deficient mice are defective in IL-12-mediated signaling despite the presence of high affinity IL-12 binding sites." J Immunol **165**(11): 6221-8.
- Wurster, A. L., T. Tanaka et M.J. Grusby (2000). "The biology of Stat4 and Stat6." Oncogene **19**(21): 2577-84.
- Xia, Y., V. Vetvicka, J. Yan, M. Hanikyrova, T. Mayadas et G.D. Ross (1999). "The beta-glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells." J Immunol **162**(4): 2281-90.
- Yang, J., H. Zhu, T.L. Murphy, W. Ouyang et K.M. Murphy (2001). "IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production." Nat Immunol **2**(2): 157-64.
- Yokota, T., T. Otsuka, T. Mosmann, J. Banchereau, T. DeFrance, D. Blanchard, J.E. De Vries, F. Lee et K. Arai (1986). "Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(16): 5894-8.
- Yoon, Y. H., J. K. Cho, Y.J. Baek Et C.S. Huh (1999). "Antimutagenic activity of *Lactobacillus* ssp. isolated from kefir and yoghurt and non-starter strains." Korean Journal of Animal Science **41**: 39-44.
- Yoshino, S., T. Tabata, S. Hazama, N. Iizuka, K. Yamamoto, M. Hirayama, A. Tangoku et M. Oka (2000). "Immunoregulatory effects of the antitumor polysaccharide lentinan on Th1/Th2 balance in patients with digestive cancers." Anticancer Res **20**(6C): 4707-11.
- Yun, C. H., A. Estrada, A. Van Kessel, B.C. Park et B. Laarveld (2003). "Beta-glucan, extracted from oat, enhances disease resistance against bacterial and parasitic infections." FEMS Immunol Med Microbiol **35**(1): 67-75.
- Zamfir, M., R. Callewaert, P.C. Cornea, L. Savu, I. Vatafu et L. De Vuyst (1999). "Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801." J Appl Microbiol **87**(6): 923-31.

Zhang, L. et I. R. Tizard (1996). "Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate fraction from Aloe vera gel." Immunopharmacology 35(2): 119-28.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Milieu RCW (*Rogosa Cheese Whey*)

500 ml	Perméat de lactosérum déprotéiné (recette ci-dessous)
30 g	Rogosa SL Broth Difco
660 µl	Acide acétique glacial

Bouillir 4 minutes à 121°C à l'autoclave.

Entreposer à 4°C.

Le milieu doit être à température pièce pour l'inoculation.

Perméat de lactosérum déprotéiné

62,5 g Poudre de perméat de lactosérum

Diluer dans l'eau distillée pour obtenir un volume final de 1 L, dans une bouteille avec un tuyau, recouverte d'un bouchon en mousse.

Bouillir 10 minutes à 121°C à l'autoclave pour dénaturer les protéines.

Filtrer sur papier Whatman No.1 afin d'éliminer les protéines précipitées.

ANNEXE 2 : Dosage des protéines (Lowry)

Solution 1 : Na_2CO_3 1 M dans NaOH 250 mM

10,6 g Na_2CO_3

1 g NaOH

Diluer dans un volume final de 100 ml d'eau distillée. Filtrer et conserver à TP.

Solution 2 : A + B (1 : 1)

A : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,2% (p/v)

B: Sodium potassium tartrate 0,4% (p/v)

Solution 3 : Folin : H_2O (1 : 3)

ANNEXE 3 : Eau DEPC

100 µl diéthylpyrocarbonate (DEPC)*
1 L eau déionisée

Sous une hotte chimique, diluer le DEPC dans l'eau déionisée pour obtenir une concentration finale de 0,01 % (v/v).

Incuber 18 heures à 37°C.

Autoclaver pour inactiver le DEPC et entreposer à TP.

*Le DEPC est conservé dans un pot de métal contenant des billes asséchantes, afin d'empêcher l'humidité de réagir avec le DEPC, qui peut alors exploser.

ANNEXE 4 : Transcription inverse

(ProtoScript™ First Strand cDNA Synthesis kit de NEB, Cat No. E6500S)

<u>Solution 1</u> :	2 µl	amorces universelles dT ₂₃
	4 µl	dNTP
<u>Solution 2</u> :	2 µl	tampon 10x pour l'enzyme M-MuLV
	1 µl	inhibiteur de RNase
	1 µl	transcriptase inverse M-MuLV

À 10 µl d'ARN, la solution 1 est ajoutée (6 µl) et le tout est incubé 5 minutes à 70°C.

La solution 2 (4 µl) est ensuite ajoutée, suivie d'une incubation de 1 h à 42°C.

ANNEXE 5 : PCR

<u>Solution 1</u> :	1,25 μ l	amorce forward GAPDG
	1,25 μ l	amorce reverse GAPDG
	1,25 μ l	amorce forward spécifique (IL-1 ou IL-12 murines)
	1,25 μ l	amorce reverse spécifique (IL-1 ou IL-12 murines)
	0,50 μ l	dNTP à 10 mM chacun
	1,25 μ l	de tampon 10x pour la Taq
	5,75 μ l	eau distillée
<u>Solution 2</u> :	1,25 μ l	tampon 10x pour la Taq
	0,25 μ l	Tween 20 à 5% (v/v)
	0,20 μ l	Polymérase Taq à 5 U/ μ l
	9,55 μ l	eau distillée

ANNEXE 6 : Gel d'agarose 0,9% (p/v)

<u>Petit gel</u>	<u>Moyen gel</u>	
45	125 ml	TBE 1x (recette ci-dessous)
0,41	1,125 g	Agarose
45 + 220	125 + 1700 µl	Bromure d'éthidium (BrEt) (recette ci-dessous)

Dissoudre l'agarose dans le TBE en chauffant une minute (ou deux) au micro-onde dans un Erlenmeyer recouvert d'un bouchon en mousse.

Lorsque la température est redescendue autour de 60°C, ajouter 45 µl (ou 125 µl) de bromure d'éthidium 1000x.

Couler le gel dans un moule pour petit gel dont les extrémités ont été fermées avec du ruban adhésif.

Glisser un peigne de 8 puits (ou 2 peignes de 20 puits chacun) dans le gel et laissez-le figer.

Une fois le gel figé, retirer le peigne et le ruban adhésif et déposer le gel et son support en plastique dans une cuve à électrophorèse remplie de TBE 1x (220 ml + 220 µl de BrEt 1000x ou 1700 ml + 1700 µl de BrEt 1000x).

Appliquer 100V pendant 1-1h15. Prendre une photo du gel au lecteur Gel Doc 1000 (Bio-Rad).

TBE 10x

108 g	Tris [890 mM] _f
55 g	acide borique [890 mM] _f
40 ml	EDTA 500 mM pH 8,0 [20 mM] _f (recette ci-dessous)

Diluer dans l'eau distillée pour obtenir un volume final de 1 L.

Filtrer sur 0,22 µm sous pression pour éviter les cristaux qui entraîneraient la cristallisation de la solution, qui est prêt de la limite critique de dissolution.

Conserver à TP.

TBE 1x

Dissoudre le TBE 10x dans l'eau distillée 1/10. Conserver à TP.

Bromure d'éthidium 1000x

50 mg bromure d'éthidium

100 ml eau

EDTA 500 mM pH 8.0

186,1 g Na₂EDTA x 2H₂O

Dissoudre dans 800 ml d'eau distillée et ajuster le pH à 8,0 avec du NaOH 10 N. Le EDTA se dissout environ à ce pH, donc la dissolution est assez longue.

Compléter le volume à 1 L avec de l'eau distillée.

Conserver à TP.

Tampon de chargement pour l'ADN 6x

0,25% (p/v) Bleu de Bromophéno 500

0,25% (p/v) Xylène cyanol 5000

20% (v/v) Ficoll 400 dans l'eau (ou 30% (v/v) de glycérol dans l'eau)

Conserver à TP.

Standard de poids moléculaire d'ADN (kb ladder)

10,0 µl Ladder 1 kb + à 1 µg/µl

10,0 µl TBE 10x

16,7 µl Tampon de chargement 6x Maniatis No.2

63,3 µl H₂O

[ladder]_f = 0,1 µg/µl

Conserver à -20°C.

ANNEXE 7 : ACK

1,008 g	NaHCO ₃
8,29 g	NH ₄ Cl
0,037 g	EDTA

Dissoudre dans 400 ml d'eau distillée et ajuster le pH à 7,2 avec du HCl 1N.

Compléter le volume à 500 ml avec de l'eau distillée.

Filtrer pour stériliser avec un filtre 0,22 µm

Conserver à 4°C.

ANNEXE 8 : Amorces

Toutes les paires d'amorces chevauchent deux exons du gène amplifié.

La formule utilisée pour approximer la Tm est la suivante : $4(C+G) + 2(A+T)$

GAPDG

Forward : 5' CCTTCATTGACCTCAACTACAT 3' Tm = 62°C

Reverse : 5' CCAAAGTTGTCATGGATGACC 3' Tm = 62°C

Fragment amplifié : 350 pb

IL-1 α murine

Forward : 5' CATCTCTCTCTGAATCAGAAATCC 3' Tm = 68°C

Reverse : 5' GCAACTCCTTCAGCAACACGG 3' Tm = 66°C

Fragment amplifié : 553 pb

IL-12 p40 murine

Forward : 5' TTGTAGAGGTGGACTGGACTCC 3' Tm = 68°C

Reverse : 5' GATGATGTCCCTGATGAAGAAGC 3' Tm = 68°C

Fragment amplifié : 598 pb

