

Université du Québec
INRS-Institut-Armand-Frappier

**LE RÔLE IMMUNOSTIMULATEUR DE DEUX SOUCHES DE
LACTOBACILLUS RHAMNOSUS, ATCC 9595 et RW-9595M, L'UNE NON-
MUÇOÏDE ET L'AUTRE MUÇOÏDE, CHEZ LA SOURIS**

Par

Sylvie Chabot

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Albert Descoteaux Centre de Recherche en Santé Humaine
Examineur externe	Lucie Lamontagne Département des Sciences Biologiques UQAM
Directrice de recherche	Monique Lacroix Centre de Recherche en Microbiologie et Biotechnologie
Codirecteur de recherche	Daniel Oth Centre de Recherche en Santé Humaine

© droits réservés de Sylvie Chabot, 2001

Table des matières

Table des matières.....	ii
Liste des figures.....	v
Liste des tableaux.....	vi
Liste des abbréviations	vii
Résumé	ix
Remerciements	x
Introduction.....	1
1. REVUE DE LITTÉRATURE.....	3
Chapître 1	4
Les bactéries lactiques	4
1.1 Introduction.....	4
1.2 Le yogourt.....	4
1.3 Les probiotiques.....	6
1.4 La microflore intestinale.....	8
1.4.1 Le genre <i>Lactobacillus</i>	10
1.4.2 Le genre <i>Bifidobacterium</i>	11
Chapître 2	12
Les exopolysaccharides.....	12
2.1 Introduction.....	12
2.2 Fonctions des exopolysaccharides.....	12
2.3 Composition et structure.....	13
2.4 Facteurs influençant la productivité.....	17
2.5 Génétique des bactéries productrices d'EPS	18
2.6 Utilisations des exopolysaccharides	19
Chapître 3	21
Le système immunitaire.....	21
3.1 Description.....	21
3.2 Phagocytes et réponse non-adaptative.....	21
3.3 Lymphocytes et réponse adaptative.....	23
3.4 Immunité intestinale	29
3.5 Récepteurs des cellules immunitaires reconnaissant les bactéries	34
3.6 Les cytokines	35
3.6.1 TNF	36
3.6.2 IL-12.....	36
3.6.3 IFN- γ	37
3.6.4 IL-4.....	38
3.7 Modulation de la production de cytokines.....	38
3.7.1 Par des bactéries	38
3.7.2 Par des produits bactériens	39

2. MÉTHODOLOGIE	41
1. Milieux de culture	42
1.1 Croissance bactérienne	42
2. Micro-organismes	43
2.1 Souches bactériennes	43
2.2 Suivi de la croissance	44
2.3 Détermination de la dose d'irradiation des bactéries	44
2.4 Préparation des bactéries en vue des stimulations de splénocytes	44
3. Exopolysaccharides (EPS)	44
3.1 Production des EPS	45
3.2 Extraction et purification des EPS	46
3.3 Fractionnement	46
3.4 Chromatographie	47
4. Stimulation des cellules spléniques	47
4.1 Préparation des splénocytes	47
5. Biologie moléculaire	47
5.1 Isolation de l'ARN	48
5.2 Réaction de transcriptase inverse (RT)	49
5.3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	50
6. Mesure de la prolifération cellulaire	50
6.1 Coloration au bleu de thiazolyl (MTT)	50
6.2 Cytofluorométrie	51
7. Mesure de la sécrétion de cytokines	51
7.1 TNF- α	51
7.2 IFN- γ	52
7.3 IL-6	52
7.4 IL-12	53
8. Analyses statistiques	53
3. RÉSULTATS	54
1. Comparaison des effets immunomodulateurs des deux souches de bactéries	55
1.1 TNF	55
1.2 IL-6	56
1.3 IFN- γ	56
2. Purification et fractionnement des EPS	65
3. Détermination de l'activité immunomodulatrice des EPS	68
3.1 Propriétés mitogéniques des EPS	68
3.2 Cytokines pro-inflammatoires (TNF et IL-6)	68
3.4 IFN- γ	75
4. DISCUSSION	88
1. Comparaison des effets immunostimulateurs des deux souches bactériennes	89
2. Purification et fractionnement des EPS	93
3. Activité immunomodulatrice des EPS	96
Conclusion	103
APPENDICE A	
Composition des solutions employées	105

APPENDICE B

Courbes de croissance des bactéries.....	107
---	------------

APPENDICE C

Détermination de la dose d'irradiation pour les bactéries.....	110
---	------------

APPENDICE D

Rendement des EPS produits et récupérés	112
--	------------

APPENDICE E

Analyse du contenu protéique des EPS.....	114
--	------------

APPENDICE F

Validation du bio-essai de l'IFN-γ	116
---	------------

APPENDICE G

Analyses statistiques et compilation des données.....	118
1. Sécrétion de TNF par des splénocytes de C57BL/6 stimulés avec <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595 et RW-9595M (n=6) (Fig. 4).	119
2. Sécrétion d'IFN- γ par des splénocytes de C57BL/6 stimulés avec <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595 et RW-9595M (n=6) (Fig. 5).	121
3. Sécrétion d'IL-6 par des splénocytes de C57BL/6 stimulés avec <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595 et RW-9595M (n=2) (Fig.6).	122
4. Sécrétion d'IFN- γ par des splénocytes de C57BL/6 stimulés avec F1, F2 et les EPS entiers (n=5) (Fig. 12).....	123
5. Sécrétion d'IL-6 par des splénocytes de C57BL/6 stimulés avec F1, F2 et les EPS entiers (n=5).....	125
6. Résultats des expériences ne comportant qu'une seule répétition.	127
7. Cinétique de production de l'IFN- γ par des splénocytes de souris C57Bl/6 stimulés avec F1 (Fig. 14).....	132

APPENDICE H

Exopolysaccharides from <i>Lactobacillus rhamnosus</i> RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in Human and Mouse cultured immunocompetent cells, and IFN-γ in Mouse splenocytes.....	133
Liste des références	170

Liste des figures

Figure 1 Représentation des voies métaboliques impliquées dans la biosynthèse des EPS chez <i>Lactococcus lactis</i> NIZO B40.....	15
Figure 2. Schéma des principales interactions entre différentes cytokines et leur implication dans la différenciation des lymphocytes T auxiliaires naïfs(Th0)	26
Figure 3. Modèle proposé pour les interactions complexes entre les cellules épithéliales intestinales et les cellules T de la muqueuse intestinale, soit les lymphocytes intestinaux intraépithéliaux (IEL) et les lymphocytes de la lamina propria (LPL).....	32
Figure 4. Sécrétion de TNF par des splénocytes de souris C57BL/6 stimulés avec <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595 et RW 9595M.....	59
Figure 5. Profil HPLC des EPS produits par <i>Lb. rhamnosus</i> RW-9595M	66
Figure 6. Pourcentage de lymphocytes B dans une population de splénocytes en division, lors d'une stimulation avec F1 et F2	70
Figure 7. Sécrétion d'IL-6 par des splénocytes de souris C57BL/6, BALB/c et <i>nude</i> , lors d'une stimulation de 24 heures avec F1	73
Figure 8. Sécrétion d'IL-12 p40 mesurée dans les surnageants de splénocytes de souris C57BL/6, BALB/c et <i>nude</i> stimulés 24 heures avec F1	77
Figure 9. Expression qualitative du gène de l'IFN- γ chez des splénocytes de souris C57BL/6 stimulés avec F1 et les EPS entiers (non fractionnés).....	79
Figure 10. Sécrétion d'IFN- γ par des splénocytes de souris C57BL/6 stimulés durant 24 heures avec F1	81
Figure 11. Sécrétion d'IFN- γ par des splénocytes de souris C57BL/6, BALB/c et <i>nude</i> stimulés durant 24 heures avec F1	83
Figure 12. Cinétique de production de l'IFN- γ chez des splénocytes de C57BL/6 stimulés avec F1	86

Liste des tableaux

Tableau I. Exemple d'une expérience illustrant le rapport des gènes du TNF et de l'IFN- γ par rapport au gène de GAPDH chez des splénocytes de souris C57BL/6 stimulés avec <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595 et RW-9595M.....	58
Tableau II. Mesure de la prolifération de splénocytes de souris C57BL/6 stimulés durant 48 heures avec chacune des fractions des EPS produits par <i>Lb. rhamnosus</i> RW-9595M, tel que déterminé par la coloration au bleu de thiazolyl (MTT).....	69
Tableau III. Comparaison de la sécrétion de TNF par des splénocytes de souris C57BL/6, BALB/c et <i>nude</i> , ainsi que par des macrophages murins RAW 264.7, stimulés avec F1 ou les EPS entiers.....	72
Tableau IV. Exemple d'une expérience comparant les sécrétions d'IL-12 p40 et d'IFN- γ par des splénocytes de C57BL/6 stimulés durant 24 heures avec F1 et les EPS entiers	85

Liste des abréviations

- ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
 ARN : acide ribonucléique
 ARNm : acide ribonucléique messenger
 BHI : "Brain Heart Infusion"
 BMM : "Basal Minimum Medium" ou milieu basal minimum
 ConA : concanavaline A
 DEPC : diéthylpyrocarbonate
 DMF-SDS : "dimethylformamide-sodium dodecylsulfate"
 dNTP : d-nucléotides triphosphate
 ELISA : "Enzyme-linked Immunosorbent Assay"
 EPS : exopolysaccharide
et al. : abréviation du latin "*et alii*" signifiant "et les autres"
 G-C : guanine-cytosine. Le contenu en G-C correspond au pourcentage que représentent ces deux bases dans le génome.
 GPC : "gas permeation chromatography" ou chromatographie gazeuse de perméabilité
 h : heure
 HEPES : "(N-2-hydroxyethylpiperazine)N-2-ethane sulfonic acid" ou acide sulfonique (N-2-hydroxyéthylpipérazine)N-2-éthane
 HPLC : "high pressure liquid chromatography" ou chromatographie liquide à haute pression
 H-SFM : "Hybridoma Serum-Free Medium" ou milieu pour hybridome sans sérum
 IFN : interféron
 Ig : immunoglobuline
 IL : interleukine
 kb : kilobase
 kDa : kilo Dalton
 kGy : kilo Gray
Lb. : *Lactobacillus*
Lc. : *Lactococcus*
 LPS : lipopolysaccharide
 mg : milligramme
 min : minute
 mL : millilitre
 mM : millimolaire
 MRS : milieu répondant aux besoins nutritionnels spécifiques des lactobacilles, mis au point par de Man, Rogosa et Sharpe (1960)
 MolV : "Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase" ou transcriptase inverse du virus de la leucémie murine de Moloney
 N : normale
 ng : nanogramme
 NK : "natural killer" ou cellules tueuse naturelle
 nm : nanomètre
 °C : degré Celsius
 • pb : paire de bases

PBS : "phosphate buffered saline" ou solution saline tamponnée au phosphate

PCR : "polymerase chain reaction" ou réaction en chaîne de la polymérase

RT : "reverse transcriptase" ou réaction de transcriptase inverse

s : seconde

SBF : sérum bovin fœtal

Taq polymérase : polymérase de *Thermus aquaticus*

TCA : "trichloroacetic acid" ou acide trichloroacétique

TNF : "tumor necrosis factor" ou facteur nécrosant des tumeurs

UFC : unité formatrice de colonie

UV : ultraviolet

μg : microgramme

μL : microlitre

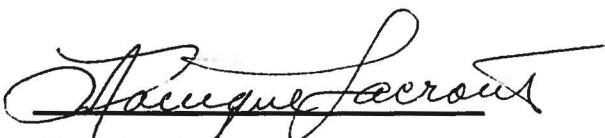
μM : micromolaire

Résumé

Deux souches de *Lactobacillus rhamnosus*, ATCC 9595 et son variant mucoïde RW-9595M, ont été comparées quant à leurs propriétés immunostimulantes sur le système immunitaire murin. Dans un premier temps, des splénocytes de souris C57Bl/6 ont été stimulés et incubés en présence de chacune des souches bactériennes irradiées, à des concentrations définies, durant 6 ou 24 heures. La sécrétion de cytokines dans les surnageants a ensuite été mesurée à l'aide de bio-essais. *Lb. rhamnosus* ATCC 9595 induit une sécrétion significativement plus élevée de TNF ($p \leq 0,05$) par les splénocytes murins, comparativement à *Lb. rhamnosus* RW-9595M. De plus, ces deux souches induisent à des niveaux similaires la sécrétion d'IFN- γ par les cellules spléniques. Dans un deuxième temps, les EPS synthétisés par la souche mucoïde *Lb. rhamnosus* RW-9595M ont été produits en fermenteur, isolés, purifiés et fractionnés par filtration sur membranes de différentes porosités. Quatre fractions ont été recueillies : F1 >1000 kDa ; F2 100-1000 kDa ; F3 10-100 kDa et F4 <10 kDa. Chacune de ces fractions a été testée pour ses propriétés mitogéniques sur les splénocytes de C57Bl/6. Les résultats montrent que F1 est la fraction la plus active, comparativement aux autres fractions. Toutefois, celles-ci montrent également des activités mitogéniques sur les splénocytes stimulés. Des splénocytes de souris C57Bl/6, BALB/c et *nude* ont été incubés en présence de F1 ou des EPS entiers, à des concentrations définies, durant 6 ou 24 heures. La sécrétion de cytokines dans les surnageants a aussi été mesurée à l'aide de bio-essais ou d'ELISA. Les résultats montrent que les EPS produits par *Lb. rhamnosus* RW-9595M induisent la sécrétion d'IL-6, mais pas de TNF chez les splénocytes de souris. Ils induisent aussi la sécrétion d'IFN- γ chez les splénocytes murins. L'évaluation de la sécrétion d'IL-12 p40 montre qu'une réponse a été observée chez les splénocytes de C57Bl/6 et de BALB/C, mais pas de *nude*. Des expériences pour déterminer le type de récepteur cellulaire se liant aux EPS n'ont pas donné de résultats concluants. La réponse des splénocytes de souris *nude* mériterait des expériences plus poussées afin de mieux comprendre le phénomène de sécrétion d'IFN- γ indépendant de l'IL-12.



Étudiante



Directrice de recherche

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mes collègues au laboratoire du Dr Daniel Oth, Louis de Léséleuc et Cindy Baldwin, ainsi que Denise Cloutier, technicienne, pour les conseils techniques, le support moral et pour nos nombreuses discussions, autant scientifiques que philosophiques. Merci au Dr Blaise Ouattara, au laboratoire du Dr Monique Lacroix, pour son aide et ses conseils précieux touchant l'aspect bactériologique du projet, ainsi que pour les analyses statistiques des résultats. Merci au Dr Hanling Yu pour l'analyse des EPS au HPLC.

Merci également au Dr Denis Roy, du CRDA, à St-Hyacinthe, pour avoir gracieusement fourni les souches de bactéries, ainsi qu'à M. Barthélémy Waters, du CRDA, pour avoir consacré une petite partie de son temps pour me permettre de me familiariser avec la production des EPS en fermenteur, ainsi que leur isolement et leur purification. Merci aussi au Dr Marie-Rose Van Casteren, du CRDA, pour les précieux renseignements sur la composition chimique et la structure des EPS produits par *Lb. rhamnosus* RW-9595M.

Merci au CORPAQ pour avoir supporté financièrement ce projet de recherche, ainsi qu'à la Fondation Armand-Frappier et son commanditaire, la compagnie Lallemand Inc., pour m'avoir attribué une bourse d'excellence durant mes études.

Enfin, merci à mes parents pour m'avoir mise au monde et pour m'avoir soutenue tout au long de mon cheminement académique. Un merci tout spécial à mon conjoint, Abdou, qui a accepté de m'épauler dans la poursuite de mes rêves (ce qui impliquait de déménager à l'autre bout de la province!), ainsi qu'à mon fils, Bamba, qui m'a permis de puiser la force nécessaire dans les moments les plus difficiles que j'ai eu à affronter.

Introduction

Les bactéries lactiques sont utilisées dans la fermentation de plusieurs aliments, dans diverses parties du monde. La fermentation permet de prolonger la durée de conservation des aliments grâce à la libération d'acides et/ou de substances bactéricides. Ces deux conditions préviennent la croissance de micro-organismes pathogènes et d'altération. Le yogourt, un lait fermenté par deux souches de bactéries lactiques vivant en protocoopération, est un aliment dont Metchnikoff (1908) a vanté les vertus bienfaisantes sur la santé. Il a proposé que les bactéries du yogourt s'opposent à la croissance de bactéries "putréfiantes" dans l'intestin, ce qui expliquait la qualité de vie et la longévité des habitants de la Bulgarie, reconnus pour leur consommation régulière de yogourt. Plus récemment, on s'est intéressé aux croyances liées à la consommation des produits fermentés par les bactéries lactiques. Parmi les effets bénéfiques retrouvés, citons : la diminution de l'intolérance au lactose, la diminution du taux de cholestérol sérique, le soulagement et la prévention des colites et de la diarrhée, l'action anti-cancérigène sur certaines tumeurs et la stimulation du système immunitaire.

Le but de ce projet était d'étudier le rôle immunostimulateur de deux souches de bactéries lactiques probiotiques potentielles. Deux souches de bactéries lactiques, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 et *L. rhamnosus* RW-9595M, la première non-mucoïde et la seconde mucoïde, ont été comparées quant à leur capacité de stimuler des cellules immunocompétentes de souris. Par la suite, des EPS ont été produits par la souche mucoïde, puis isolés et purifiés afin de vérifier leur activité immunostimulante, tel qu'il a déjà été rapporté pour d'autres souches de bactéries mucoïdes. Pour ce faire, des splénocytes de souris ont été stimulés, soit avec différentes concentrations des souches de bactéries entières, soit avec différentes concentrations d'EPS. Les cytokines produites lors de la stimulation ont été mesurées à l'aide de bio-essais spécifiques ou d'ELISA. L'activation du gène codant pour quelques cytokines a parfois été vérifiée à l'aide de la technique du RT-PCR.

La présente dissertation débutera avec une revue de littérature sur le sujet abordé. Ensuite, les résultats obtenus seront présentés, puis discutés. Enfin, une conclusion permettra de faire le point sur les principaux résultats acquis durant ce projet, ainsi que sur les pistes qui semblent intéressantes pour la poursuite éventuelle de travaux sur le sujet.

1. Revue de littérature

Chapître 1

Les bactéries lactiques

1.1 Introduction

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis les temps bibliques comme agents de préservation ou de fermentation. Elles se retrouvent dans plusieurs aliments : lait, légumes, céréales, breuvages et produits laitiers (Fetlinski et Stepaniak, 1994). Dans plusieurs régions du monde, la fermentation constitue une méthode de conservation hygiénique, permettant entre autres de conserver le lait à la température ambiante durant quelques jours. Ceci est possible grâce à la forte densité des ferments lactiques dans le produit final, ainsi qu'à la production de substances antiseptiques (acide lactique, bactériocines) lors de la fermentation (Antoine, 1997). Les bactéries lactiques appartiennent surtout aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Bifidobacterium*, et constituent une part importante des microflores intestinale et génito-urinaire des animaux à sang chaud (Conway *et al.*, 1986 ; Charteris *et al.*, 1997 ; Holzapfel *et al.*, 1998).

1.2 Le yogourt

Le yogourt est traditionnellement obtenu par la fermentation lactique du lait par *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. Ces deux microorganismes croissent en un type d'association nommé protocoopération. Ce terme signifie que l'interaction entre les deux bactéries est bénéfique, mais non essentielle à leur croissance. En protocoopération, chaque partenaire synthétise une substance absente du milieu initial et qui profite à l'autre partenaire lors de la croissance (Hartley et Denariatz, 1993). *Lb. bulgaricus*, le plus protéolytique des deux, libère des acides aminés lors de la fermentation du lait (Beshkova *et al.*, 1998), ce qui favorise une meilleure croissance de *S. thermophilus*. En retour, *S. thermophilus* synthétise de l'acide formique nécessaire à la biosynthèse des purines chez *Lb. bulgaricus*. Aussi, *S. thermophilus* possède des uréases qui effectuent la décarboxylation de l'urée, produisant ainsi du CO₂ qui entre dans la

biosynthèse de l'aspartate chez *Lb. bulgaricus* (Hartley et Denariáz, 1993). Il existe aussi d'autres types de laits fermentés par des souches de bactéries lactiques différentes de celles utilisées pour le yogourt. Le kéfir est un lait fermenté à l'aide de "grains" composés de divers lactobacilles et levures et originaire des régions du Caucase (Micheli *et al.*, 1999). Le viili, d'origine scandinave, est un lait fermenté par *Lactococcus lactis* (Kitazawa *et al.*, 1991b).

Lors de la fermentation du lait, il se produit une modification des nutriments: hydrolyse partielle des protéines, coagulation en fines particules et ionisation des minéraux, surtout du calcium (Antoine, 1997). Il se produit également une apparition de métabolites, dont certaines vitamines, et d'autres qui sont responsables du développement de la saveur, comme l'acide lactique, l'acétaldéhyde, l'acétone et le diacétyl (Goulet, 1984). Enfin, la croissance des ferments lactiques vivants et actifs s'effectue jusqu'à atteindre une concentration finale de 10^8 ferments/g (Antoine, 1997).

L'idée que le yogourt est bénéfique pour la santé est vieille de plusieurs centaines d'années. Selon une légende perse, la longévité et la fécondité du prophète Abraham seraient dues à l'absorption régulière de cet aliment (Deeth et Tamine, 1981). Plus récemment, le milieu scientifique a commencé à s'intéresser aux propriétés bénéfiques du yogourt au début des années 1900. À cette époque, Metchnikoff (1908) a proposé que les microorganismes impliqués dans la fermentation lactique agissent comme antagonistes des microorganismes putréfiants de l'intestin, et qu'une fois introduits dans l'intestin, ils préviennent le développement des microorganismes nocifs ou pathogènes. Cette hypothèse était basée sur ses observations faites sur les habitants de la Bulgarie, reconnus pour leur consommation régulière de yogourt et pour leur état de santé remarquable. Des études récentes chez l'humain et la souris ont tenté de vérifier le bien-fondé des croyances reliées aux propriétés bénéfiques du yogourt et des laits fermentés. Une étude a démontré qu'après infection avec *Salmonella typhimurium*, des souris nourries avec une diète à base de yogourt avaient un niveau d'IgA sériques significativement plus élevé que les souris témoins nourries avec une diète à base de lait en poudre (Puri *et al.*, 1996). D'autres études chez l'humain ont démontré que la consommation de yogourt pouvait

contribuer à augmenter la digestibilité du lactose chez les personnes intolérantes, en augmentant le niveau de β -galactosidase (Lerebours et Somerset, 1993). De plus, selon Halpern *et al.* (1991), la consommation prolongée de yogourt contenant des bactéries actives contribuerait à une meilleure assimilation du calcium. Selon Hilton *et al.* (1992), la consommation régulière de yogourt pourrait même aider à réduire l'incidence des vaginites à *Candida albicans*. Selon plusieurs auteurs, une consommation régulière de bactéries vivantes du yogourt serait en mesure d'induire une production élevée d'IFN- γ (Halpern *et al.*, 1991 ; De Simone *et al.*, 1993 ; Wheeler *et al.* 1997b), et même de diminuer certains symptômes allergiques (Trapp *et al.*, 1993 ; Dugas *et al.*, 1999). Il est à noter qu'une consommation chronique de yogourt ou de lait fermenté (grande quantité sur une période prolongée) ne semble induire aucun effet nocif sur la santé des consommateurs (Wheeler *et al.*, 1997a; Halpern *et al.*, 1991; Spanhaak *et al.*, 1998). Enfin, selon certains auteurs (Perdigon *et al.*, 1995 et 1998 ; Kitazawa *et al.*, 1990), le yogourt et les laits fermentés posséderaient des propriétés anticancéreuses. Certains métabolites libérés durant la fermentation du lait (yogourt, Kéfir, Viili) tels l'acide palmitique (Bakalinski *et al.*, 1996), ou des polysaccharides (Kitazawa *et al.*, 1991a et 1991b) pourraient être responsables de cet effet anticancéreux.

1.3 Les probiotiques

Les bactéries traditionnelles du yogourt commercial, *Lb. bulgaricus* et *S. thermophilus*, sont plus ou moins résistantes aux conditions retrouvées dans le tractus gastro-intestinal : acide gastrique, sels biliaires, mouvements péristaltiques (Fetlinski et Stepaniak, 1994). Ainsi, d'autres bactéries lactiques, apparentées à celles de la microflore intestinale, peuvent être supplémentées au yogourt commercial. Celles-ci auraient vraisemblablement de meilleures chances de survie et de colonisation, tout en apportant des effets bénéfiques au consommateur. Une bactérie introduite dans le tractus gastro-intestinal dans le but de modifier de façon favorable l'équilibre des populations bactériennes de la microflore indigène de l'hôte et de lui procurer certains bienfaits est dite probiotique (Fuller, 1989 ; Dugas *et al.*, 1999). Parmi les aliments pouvant servir de vecteur aux probiotiques, citons entre autres, les laits fermentés, le yogourt, les fromages (cheddar, cottage), la crème glacée et le lait de soja fermenté (Charteris *et al.*, 1997).

Selon Fuller (1989), un bon probiotique doit être capable d'exercer un effet bénéfique sur l'hôte, animal ou humain, doit être non-pathogène et non-toxique, doit survivre aux conditions d'entreposage et doit être capable de survivre, de métaboliser et de demeurer en nombre élevé dans les conditions prévalant dans l'intestin. Parmi les probiotiques les plus étudiés, *Lb. rhamnosus* GG a démontré une excellente capacité à survivre et à coloniser le tractus gastro-intestinal, tant chez les adultes que chez les enfants (Alander *et al.*, 1997). D'autres souches de lactobacilles peuvent également coloniser la muqueuse intestinale (Conway *et al.*, 86; Rojas et Conway, 1996), et même demeurer viables dans l'intestin jusqu'à 11 jours après l'arrêt de leur ingestion (Johansson *et al.*, 1993). En effet, la colonisation par les bactéries lactiques probiotiques n'est pas permanente et leur nombre diminue dans les fèces après cessation de leur ingestion (Spanhaak *et al.*, 1998). C'est pourquoi, afin de s'assurer que les probiotiques soient présents en grand nombre et soient capables de produire leur effet, leur administration doit être continue (Fuller, 1989).

Les probiotiques sont souvent utilisés comme supplément alimentaire chez les animaux (volaille, porc, bétail) afin de réduire ou d'éliminer l'emploi des antibiotiques utilisés dans le but d'augmenter le taux de croissance et de diminuer l'incidence des maladies (Fuller, 1989). Ils peuvent aussi agir comme inhibiteurs de la croissance de micro-organismes pathogènes ou d'altération dans divers aliments (Champagne *et al.*, 1990; Piard *et al.*, 1992). Des études chez la souris ont démontré les propriétés adjuvantes de *Lb. casei* et de *Bifidobacterium infantis*, respectivement dans le traitement du choléra (Portier *et al.*, 1993) et de certaines tumeurs (Sekine *et al.*, 1994). Chez les jeunes enfants, *Lb. casei* GG s'est avéré efficace dans la prévention et le traitement de la diarrhée à rotavirus (Isolauri *et al.*, 1991). D'autres études suggèrent que plusieurs souches de bactéries lactiques pourraient aider à réduire le niveau de cholestérol sérique (Marteau et Rambaud, 1993 ; Nakajima, 1995). Ces bactéries seraient aussi en mesure d'agir directement sur des pathogènes, comme *Helicobacter pylori*, en inhibant leur croissance grâce à l'acide lactique et probablement aussi d'autres métabolites (Midolo *et al.*, 1995; Kasper, 1998). Des souches de lactobacilles ont la capacité de limiter l'adhésion de pathogènes (*Staphylococcus aureus* et *C. albicans*) aux cellules uro-épithéliales (Reid *et*

al., 1995). Selon Velraeds *et al.* (1996), la production de biosurfactants par des lactobacilles serait responsable de l'inhibition de l'adhésion de l'uro-pathogène *Enterococcus faecalis*. Des lactobacilles auraient apparemment été utilisés avec succès dans le traitement des infections urinaires récurrentes causées par *S. aureus* et *C. albicans* (Bruce *et al.*, 1992).

Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont démontré les propriétés anticancéreuses des bactéries lactiques sur des tumeurs induites chez des rongeurs en provoquant leur suppression ou en limitant la croissance tumorale (Kitazawa *et al.*, 1991a ; Kitazawa *et al.*, 1991b ; Fernandes et Shahani, 1990 ; Perdigon *et al.*, 1993 ; Matsuzaki, 1998). L'action anticancérigène peut s'effectuer directement, en diminuant les substances procancéreuses, ou indirectement, en diminuant le niveau des enzymes qui convertissent les substances procancérigènes en cancérogènes (Fernandes et Shahani, 1990 ; Kasper, 1998 ; Spanhaak *et al.*, 1998). Pool-Zobel *et al.* (1996) ont démontré que plusieurs souches de bactéries lactiques sont capables d'inhiber la génotoxicité induite par la N-méthyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) dans le tractus gastro-intestinal des rats. Cependant, cet effet protecteur *in vivo* n'était atteint qu'avec des bactéries viables seulement. Enfin, des bactéries lactiques vivantes appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus* seraient en mesure de stimuler le système immunitaire en régulant la production de cytokines (Marin *et al.*, 1998 ; Miettinen *et al.*, 1997 et 1998). Portier *et al.* (1993) ont observé cet effet stimulateur avec des bactéries vivantes aussi bien que tuées par la chaleur. Rangavajhyala *et al.* (1997) ont quant à eux réussi à stimuler la production de cytokines avec des bactéries tuées par la chaleur. Cependant, d'autres auteurs ont observé une perte de cette capacité lorsque les bactéries étaient tuées par la chaleur, mais pas par irradiation, technique qui permet de conserver l'intégrité des membranes (Solis-Pereyra *et al.*, 1997).

1.4 La microflore intestinale

La microflore intestinale indigène d'un individu adulte compte environ 10^{14} bactéries vivantes (Luckey et Floch, 1972). Sur ce nombre, entre 300 et 400 espèces composent 99% de cette flore (Kimura *et al.*, 1997). Deux genres de bactéries lactiques sont

particulièrement importants: *Lactobacillus*, qui domine dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal (estomac, duodénum, jéjunum et iléum), et *Bifidobacterium* qui compose une partie importante de la flore du colon. D'autres micro-organismes se retrouvent abondamment dans la microflore intestinale, ce sont : *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Enterobacter* de même que plusieurs levures (Holzapfel *et al.*, 1998).

Avant la naissance, le tractus gastro-intestinal du fœtus est stérile. La colonisation débute, lors de l'accouchement naturel, grâce au passage dans la voie vaginale maternelle (Holzapfel *et al.*, 1998 ; Dugas *et al.*, 1999). Chez le nouveau-né, *E. coli* et *Streptococcus* prédominent d'abord la microflore intestinale. Lorsque l'enfant est allaité, les bifidobactéries augmentent et dominent déjà la microflore quelques heures après la naissance, pendant que *E. coli* et *Streptococcus* diminuent. La prolifération des bifidobactéries est stimulée par des composantes glycoprotéiques de la K-caséine présentes surtout dans le colostrum, et dans une moindre mesure le lait maternel (Charteris *et al.*, 1997). En vieillissant, la proportion relative de bifidobactéries originaux diminue alors que se produit une succession d'espèces (autres bifidobactéries, lactobacilles, entérobactéries, etc.), jusqu'à l'obtention d'une composition caractéristique d'un individu donné (Kimura *et al.*, 1997 ; Tannock, 1997). La microflore intestinale apporte plusieurs bienfaits à son hôte: exclusion compétitive des microbes exogènes souvent pathogènes, aide à la digestion de certaines substances nutritives complexes, synthèse de certaines vitamines et d'enzymes digestives et protectrices (Holzapfel *et al.*, 1998).

Des études chez l'humain et chez le porc ont suggéré que la composition de la microflore intestinale pouvait être déterminée et modifiée par différents facteurs, dont la génétique, l'alimentation, le stress, la prise de médicaments (Kimura *et al.*, 1997 ; Rychen et Nunes, 1995). Un déséquilibre de la microflore peut survenir, par exemple, suite à un traitement aux antibiotiques, et prédisposer l'individu à certaines infections (Holzapfel *et al.*, 1998 ; Fuller, 1989). D'autre part, dans des conditions de malnutrition chez les rongeurs, des études ont démontré une translocation des bactéries anaérobies de la flore intestinale vers

le foie et la rate (Perdigon *et al.*, 1995 ; Agüero *et al.*, 1996). La consommation de yogourt, mais non de lait, permettait de prévenir cette translocation.

1.4.1 Le genre *Lactobacillus*

Les lactobacilles se présentent sous la forme de bâtonnets ou de coccobacilles Gram positifs. Ils sont non-sporulants, non-mobiles et anaérobies facultatifs. Leur contenu en G-C varie entre 32 et 51%. Les lactobacilles sont strictement fermentatifs. Ils fermentent préférentiellement le glucose en acide lactique (homofermentation), mais peuvent également effectuer une hétérofermentation pour produire de l'acide lactique, du CO₂ et de l'éthanol. Jusqu'à présent, 56 espèces de lactobacilles sont reconnues (Charteris *et al.*, 1997).

Les lactobacilles se divisent en trois groupes principaux : 1) homofermentatifs obligatoires, 2) hétérofermentatifs facultatifs, et 3) hétérofermentatifs obligatoires (Stiles et Holzapfel, 1997). Quatre espèces appartenant au premier groupe (*Lb. gasseri*, *Lb. johnsonii*, *Lb. acidophilus* et *Lb. crispatus*), trois appartenant au second groupe (*Lb. casei*, *Lb. paracasei* et *Lb. rhamnosus*), et une appartenant au troisième groupe (*Lb. reuteri*) sont utilisées couramment comme probiotiques chez l'homme et les animaux (Klein *et al.*, 1998). Le groupe 3 comprend aussi des bactéries impliquées dans la détérioration des aliments (Stiles et Holzapfel, 1997). Le genre *Lactobacillus* a subi de nombreuses reclassifications au cours des dernières années, grâce aux analyses biochimiques et biomoléculaires. Par contre, malgré ces techniques, d'autres espèces demeurent difficiles à distinguer et leur position taxonomique reste obscure. L'espèce *Lb. rhamnosus* est toutefois facilement identifiable, car sa paroi cellulaire contient du rhamnose et elle est l'une des rares espèces capables de fermenter le rhamnose (Klein *et al.*, 1998).

Les lactobacilles sont distribués dans plusieurs niches écologiques des tractus gastro-intestinal et uro-génital. En effet, ils constituent une large proportion de la flore indigène du petit intestin des animaux à sang chaud (Rojas et Conway, 1996). Bien que les lactobacilles soient parfois impliqués dans des infections gastro-intestinales et extra-intestinales, ce genre est considéré comme étant non-pathogène (Charteris *et al.*, 1997).

1.4.2 Le genre *Bifidobacterium*

Les bifidobactéries sont des bactéries Gram positives, non-sporulantes, non-mobiles, anaérobies et catalase négatives. Leur contenu en G-C se situe entre 55 et 67%. Les bifidobactéries sont classées parmi les bactéries lactiques, bien qu'elles ne produisent pas uniquement de l'acide lactique à partir du glucose, mais plutôt de l'acide lactique et de l'acide acétique selon un ratio 2:3. Le principal caractère taxonomique de ce genre est la présence de l'enzyme fructose-6-phosphate phosphocétolase (Stiles et Holzapfel, 1997 ; Charteris *et al.*, 1997). Les bifidobactéries ont été isolées, au début du XXe siècle, dans les fèces de poupons et incluses sous le nom de *Lb. bifidus* jusqu'en 1986, où elles ont été transférées dans un nouveau genre, *Bifidobacterium* (Klein *et al.*, 1998). Actuellement, ce genre regroupe 29 espèces reconnues. Les espèces les plus utilisées comme probiotiques sont *B. longum* et *B. animalis* (Klein *et al.*, 1998).

Les bifidobactéries jouent un rôle important dans le gros intestin, en contrôlant le pH grâce à la libération d'acides qui restreignent la croissance de plusieurs bactéries pathogènes et "putréfiantes". Bien que des bifidobactéries soient quelquefois impliquées dans des infections génito-urinaires, seulement deux espèces sont considérées pathogènes pour l'humain: il s'agit de *B. inopinatum* et *B. denticolens* qui sont parfois présentes dans les lésions de caries dentaires (Jousimies-Somer, 1997).

Chapître 2

Les exopolysaccharides

2.1 Introduction

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polymères de glucides très hydratés. En effet, environ 99% de leur poids humide est constitué d'eau (Weiner *et al.*, 1995). Ces polymères, localisés à l'extérieur de la membrane cellulaire, se divisent en deux groupes: ceux qui sont associés à la paroi cellulaire et qui forment une capsule, et ceux qui sont sécrétés dans le milieu (Cerning, 1990 et 1994). Lorsqu'ils sont observés au microscope électronique, les EPS prennent l'aspect de fibres épaisses, formant une fine structure irradiant de la surface cellulaire. Les EPS seraient liés à un nombre limité de sites sur la paroi cellulaire, l'excès contribuant à la formation de gelée visqueuse correspondant à la présence d'EPS libres dans le milieu (Weiner *et al.*, 1995).

2.2 Fonctions des exopolysaccharides

Les bactéries qui produisent des EPS sont qualifiées de mucoïdes et vivent dans plusieurs types d'habitats : le sol (Achouak *et al.*, 1999), les milieux aquatiques (Allison et Sutherland, 1987 ; Marshall *et al.*, 1971) ou les êtres vivants, dans le cas des pathogènes particulièrement. Les EPS ne semblent pas servir de sources de carbone, puisque les bactéries formant ce type de matière visqueuse sont généralement incapables de cataboliser le polymère qu'elles synthétisent (Cerning, 1990). Il semblerait plutôt que les EPS constitueraient, en milieu naturel, un avantage adaptatif permettant de survivre dans des conditions défavorables (Weiner *et al.*, 1995). Tout d'abord, les EPS agissent comme une barrière de protection physique en formant une capsule ou une couche de mucus autour de la bactérie, ce qui la protège contre la dessiccation, les basses températures, les pressions osmotiques élevées, la phagocytose effectués par certains prédateurs, et certaines substances nocives (toxines, antibiotiques et poisons) (Baltimore et Mitchell 1980 ; Cerning, 1990). Pour les bactéries vivant chez un hôte, les EPS sécrétés protègent

contre la phagocytose et les attaques des macrophages, contre les anticorps et les antibiotiques (Weiner *et al.*, 1995 ; Lagacé et Dubreuil, 1999). Dans le cas des bactéries pathogènes, les EPS constituent un important facteur de virulence, comme par exemple l'alginate sécrétée par plusieurs espèces de *Pseudomonas* qui permettent leur persistance et la colonisation des tissus de l'hôte, animal ou végétal (Pedersen *et al.*, 1990; Yu *et al.*, 1999).

Une autre fonction des EPS est d'intervenir dans les processus de reconnaissance cellulaire et les interactions intercellulaires, comme lors de l'attachement de *Rhizobium* aux racines des Légumineuses afin de former des nodules fixateurs d'azote (Reuber et Walker, 1993). D'autre part, les EPS peuvent faciliter l'assimilation d'ions métalliques essentiels, en modifiant le gradient transmembranaire (Weiner *et al.*, 1995 ; Cerning, 1990). Enfin, les EPS peuvent intervenir dans les processus d'attachement à une surface ou dans la formation de biofilms bactériens (Weiner *et al.*, 1995).

2.3 Composition et structure

Les EPS forment une classe de molécules très hétérogène. Les homopolysaccharides sont formés de monomères identiques (dextran, mutan, levan). Ils sont synthétisés à l'extérieur de la cellule, sous l'action d'une enzyme unique, la dextransucrase, qui utilise le dextran comme substrat (Cerning, 1994 ; Ricciardi et Clementi, 2000). Les hétéropolysaccharides sont formés par la polymérisation de précurseurs, appelés sucres nucléotides, qui sont synthétisés dans le cytoplasme. Le premier sucre nucléotide se lie d'abord à un transporteur lipidique monophosphorylé C55 qui est ancré à la membrane cytoplasmique (voir figure 1). Les autres sucres nucléotides sont ensuite assemblés à la membrane de façon séquentielle sur l'unité répétitive croissante, grâce à des glycosyltransférases spécifiques (De Vuyst et Degeest, 1999 ; Ricciardi et Clementi, 2000) . Par la suite, chaque unité répétitive est exportée de l'autre côté de la membrane, grâce à des translocases (Looijesteijn *et al.*, 1999), puis polymérisée par des polymérases, afin de former les EPS de surface (Kleerebezem *et al.*, 1999). Ils peuvent contenir différents sucres, tels que glucose, galactose, mannose, rhamnose, xylose, acide glucuronique, etc.,

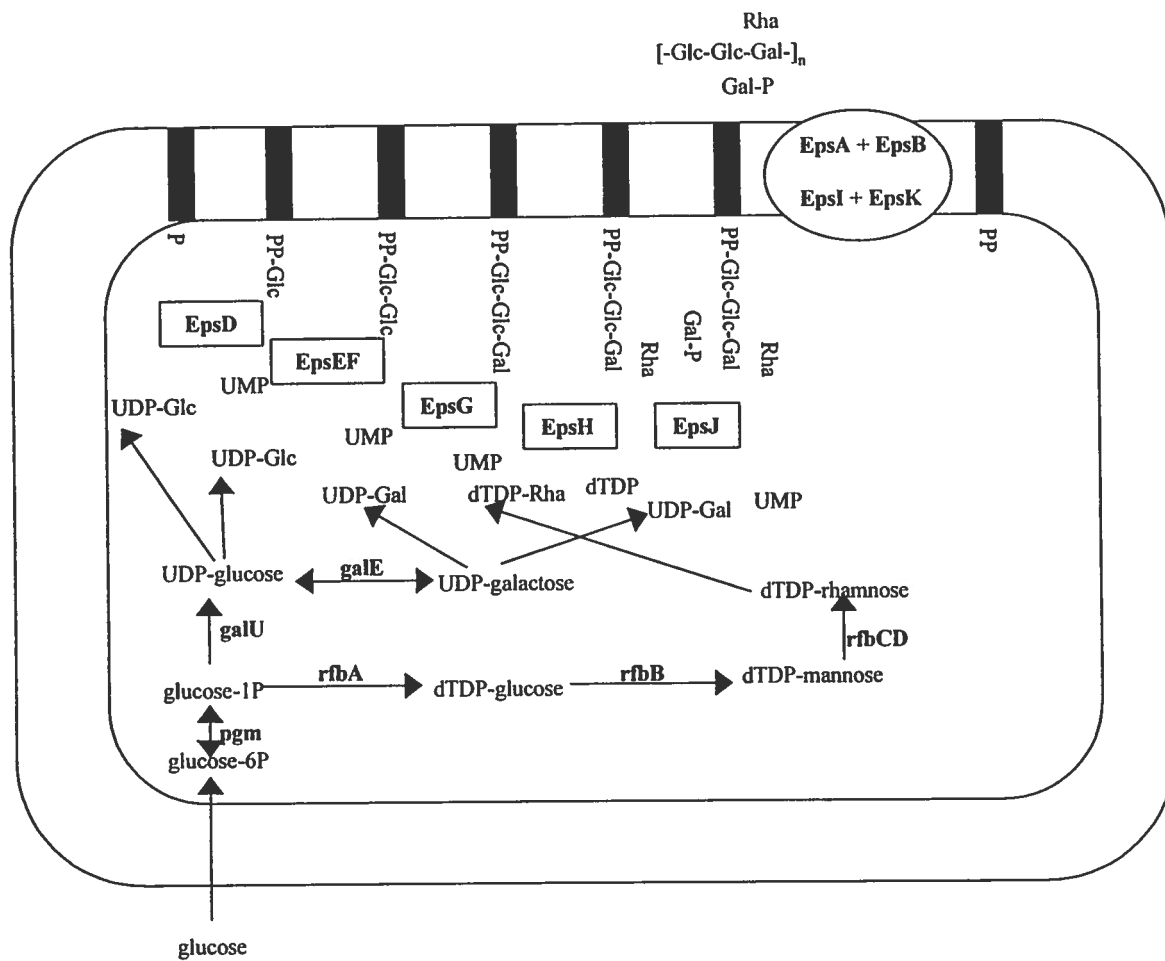
qui peuvent être arrangés selon plusieurs combinaisons possibles, ce qui leur confère différentes structures selon le cas (Weiner *et al.*, 1995).

Les EPS produits par les bactéries lactiques sont composés majoritairement de glucose, galactose et/ou rhamnose (Nakajima *et al.*, 1990 ; Grobben *et al.*, 1995 ; Vanhaverbeke *et al.*, 1998 ; van Casteren *et al.*, 2000), mais chez une même souche, la structure, c'est-à-dire la composition en monomères et les liens glycosidiques, varie selon la source de carbone utilisée et les conditions de culture (Cerning *et al.*, 1992 ; De Vuyst et Degeest, 1999). Les EPS contiennent souvent des groupements phosphorylés (Kitazawa *et al.*, 1993), sulfatés (Daniels *et al.*, 1994), aminés (Wang *et al.*, 1998) ou lipidiques (Prigozy *et al.*, 1997). Les unités répétitives arborent fréquemment une structure branchées (Micheli *et al.*, 1999 ; van Casteren *et al.*, 2000) et la molécule d'EPS peut avoir une conformation en forme d'hélice (Norisuye *et al.*, 1980).

Les EPS produits par les bactéries lactiques ont un poids moléculaire se situant entre 40 et 6000 kDa (De Vuyst et Degeest, 1999 ; Nakajima *et al.*, 1990 ; Cerning, 1994). Des EPS produits par d'autres micro-organismes ont des poids moléculaires du même ordre de grandeur : 2000-3000 kDa pour le pullulan produit par le mycète *Aureobasidium pullulans* (Thibault et LeDuy, 1999). *Bifidobacterium longum* produit quant à lui deux fractions d'EPS simultanément : 360 kDa et 1200 kDa (Abbad Andaloussi *et al.*, 1995), tout comme *S. thermophilus* LY03 : 1800 kDa et 410 kDa (Degeest et De Vuyst, 1999). Dans ce dernier cas, la composition en monomères est identique pour les deux fractions : la petite fraction est probablement un produit de dégradation du polymère de plus haut poids moléculaire (Degeest et De Vuyst, 1999). D'autres auteurs ont aussi remarqué un phénomène de dégradation du polymère après une période d'incubation prolongée. Chez *S. thermophilus*, la dégradation serait due à la présence d'hydrolases dans le milieu (Gancel et Novel, 1994). Aussi, chez *A. pullulans*, les polymères de plus haut poids moléculaires se retrouvent après 24 heures d'incubation ; après quoi l'action des enzymes hydrolytiques présentes dans le milieu fait diminuer le poids moléculaire moyen du polymère (Thibault et LeDuy, 1999).

Figure 1 Représentation des voies métaboliques impliquées dans la biosynthèse des EPS chez *Lactococcus lactis* NIZO B40

La biosynthèse des sucres nucléotides (en bas) s'effectue à partir du glucose utilisé comme source de carbone. Suivent ensuite les étapes encodées par les gènes de l'opéron *eps*, soit l'assemblage des sucres nucléotides sur le transporteur lipidique ancré à la membrane afin de former l'unité répétitrice, l'exportation des unités répétitrices, puis la polymérisation (en haut). Les enzymes du métabolisme général, de même que les produits (enzymes EpsA à EpsK) des gènes *eps* sont indiqués en caractère gras : galE, UDP-glucose 4-isomérase ; galU, UDP-glucose synthase ; pgm, phosphoglucomutase ; rfbA, dTDPglucose pyrophosphatase ; rfbB, dTDPglucose déhydratase ; rfbCD, dTDP-rhamnose "synthesising enzyme system". Glc, glucose ; Gal, galactose ; Rha, rhamnose ; UDP-Glc, UDP-Gal et dTDP-Rha sont les sucres nucléotides. (Adapté de Kleerebezem *et al.*, 1999, Antonie van Leeuwenhoek, vol. 76, p. 359).



2.4 Facteurs influençant la productivité

Des auteurs rapportent une composition indépendante des conditions de culture (Gamar-Nourani *et al.*, 1998). À l'inverse, d'autres ont trouvé que les conditions de culture peuvent influencer la composition du polymère synthétisé. De plus, la production des EPS est parfois associée à la croissance (Grobbsen *et al.*, 1995; Gamar *et al.*, 1997 ; De Vuyst *et al.*, 1998). Selon Cerning *et al.* (1994), *L. casei* CG11 montre une production accrue d'EPS en ayant le glucose comme source de carbone, pendant que la croissance demeure constante. Chez *Lb. casei*, la production est plus importante avec le galactose (Mozzi *et al.*, 1995). Cependant, un mélange de fructose et glucose induit une meilleure production d'EPS, comparativement au fructose seul chez *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Grobbsen *et al.*, 1996). Ces derniers ont noté l'absence d'activité des enzymes menant à la synthèse de nucléotides de rhamnose; par conséquent, le polymère synthétisé ne contenait aucun monomère rhamnose. *Lactobacillus reuteri* LB 121 produit une grande quantité d'un glucan (d-glucose) de 3500 kDa et d'un levan (β -d-fructofuranan) de 150 kDa, en présence de sucrose. C'est le premier exemple de biosynthèse d'un levan par une espèce de lactobacille (van Geel-Schutten *et al.*, 1999). *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* produit des EPS avec du glucose ou du lactose comme source de carbone (Grobbsen *et al.*, 1995), mais dans ce dernier cas, il se produit une accumulation de galactose dans le milieu de culture, le glucose servant vraisemblablement à la croissance de la bactérie. Chez une bifidobactérie, *B. longum*, le polymère formé ne contient aucun mannose, mais plutôt du glucose, du galactose et de l'acide uronique dans un ratio 4:4:1 (Abbad Andaloussi *et al.*, 1995).

L'ajout de minéraux ($MnSO_4$, $CaCl_2$) dans le milieu de culture est un autre facteur qui permet d'augmenter la quantité d'EPS synthétisés (Mozzi *et al.*, 1995). La température peut aussi exercer une influence sur la productivité: une baisse de quelques degrés, de 37 °C à 25 °C, permet une production accrue chez *Lb. rhamnosus* C83 (Gamar *et al.*, 1997 ; Gamar-Nourani *et al.* 1998). Le mode de culture joue aussi un rôle dans la quantité d'EPS produits. Ainsi, l'utilisation d'un substrat solide (résidus de grains de malt imprégnés de milieu liquide) lors de la fermentation permettrait d'augmenter de 2 à 4 fois le rendement d'EPS bactériens produits, comparativement à la fermentation en culture

submergée (Stredansky *et al.*, 1999). La production d'EPS par les bactéries lactiques se situe généralement entre 50 et 500 mg/L de polymère (Kleerebezem *et al.*, 1999). Cependant, *Lb. rhamnosus* RW-9595M est l'une des meilleures souches productrices d'EPS connues à ce jour, produisant jusqu'à 1200 mg/L d'EPS (Dupont *et al.*, 2000).

2.5 Génétique des bactéries productrices d'EPS

La perte du caractère mucoïde est un phénomène qui survient fréquemment chez les souches de bactéries lactiques au fil des passages. Pour l'industrie laitière, la perte de ce caractère constitue un réel problème (De Vuyst et Degeest, 1999). C'est pourquoi plusieurs recherches visent à améliorer l'aspect génétique des souches d'intérêt, afin d'obtenir une meilleure production.

Le caractère mucoïde est associé à un plasmide chez les bactéries lactiques mésophiles (Cerning, 1990 et 1994). *Lc. lactis* possède un grand plasmide de plus de 20 kb (van Kranenburg *et al.*, 1997 ; Kleerebezem *et al.*, 1999). Celui-ci peut être transféré par conjugaison entre deux souches de lactocoques (van Kranenburg *et al.*, 1999 ; Kleerebezem *et al.*, 1999). Cependant, chez les bactéries lactiques thermophiles, les gènes responsables de ce caractère semblent plutôt se situer au niveau chromosomique (De Vuyst et Degeest, 1999). Les séquences spécifiques des gènes impliqués dans la production des EPS sont connues pour quelques souches de *S. thermophilus*, de *Lc. lactis* et de *Lactobacillus* (De Vuyst et Degeest, 1999). L'organisation, la direction de transcription et les fonctions apparentes des gènes dans les différents opérons *eps* semblent hautement conservés chez toutes ces souches. Les gènes, au nombre de 13 (*epsA* à *epsM*) (Stingele *et al.*, 1996 ; van Kranenburg *et al.*, 1999), sont organisés en trois régions fonctionnelles: une région centrale avec des gènes homologues à des glycosyltransférases spécifiques à la biosynthèse des unités répétitives, deux régions aux extrémités de la région centrale homologues à des enzymes impliquées dans la polymérisation et l'exportation, et une région régulatrice située à l'extrémité de l'opéron (De Vuyst et Degeest, 1999). Les enzymes menant à la formation des EPS se divisent en 4 groupes: celles responsables du métabolisme initial de l'hydrate de carbone, celles participant à la synthèse des sucres nucléotides et à leur interconversion, celles qui

forment l'unité répétitive attachée au transporteur lipidique, soit les glycosyltransférases, et celles formant le polymère, soit les translocases et polymérases (Looijesteijn *et al.*, 1999). Les gènes des deux derniers groupes, situés sur le plasmide, sont sous le contrôle du promoteur *eps*, dont l'activité est indépendante de la source de carbone (Looijesteijn *et al.*, 1999). Les gènes des enzymes du deuxième groupe sont essentiels à la formation des sucres de la paroi cellulaire, mais ne sont pas situés sur le plasmide (van Kranenburg *et al.*, 1997). La surexpression du gène d'activation de la glycosyltransférase (*epsD*) chez *Lc. lactis* amène une augmentation de la production d'EPS. Une bonne approche pour augmenter la production des EPS serait ainsi d'augmenter le niveau d'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse (*epsA* à *epsM*), par exemple en les clonant sur un plasmide multicopies (van Kranenburg *et al.*, 1999).

2.6 Utilisations des exopolysaccharides

Les polysaccharides microbiens jouent des rôles très importants, tant du point de vue commercial que médical. Le dextran est un EPS parmi les plus utilisés et les plus étudiés. Il est couramment utilisé comme agent protecteur dans l'enrobage des graines, comme agent défloculant dans l'industrie papetière et dans les procédés de platinage métallurgique (Cerning, 1990 ; De Vuyst et Degeest, 1999). Dans le domaine médical, on l'utilise dans les fils à suturer ou pour former une couche hydrophile sur les brûlures, ou encore en exploitant sa capacité d'expansion et d'absorption du sang (Cerning, 1990 ; De Vuyst et Degeest, 1999).

Les EPS sont aussi présents dans les industries de la peinture et des plastiques, dans des programmes secondaires de récupération du pétrole, ainsi que dans les industries alimentaires où ils remplacent l'alginate d'origine algale et les gommés végétales, afin d'améliorer la viscosité de certains aliments. Par exemple, l'industrie laitière exploite les capacités de rétention de l'eau des EPS produits par les bactéries lactiques afin d'améliorer les propriétés rhéologiques (i.e. la texture et la consistance) des laits fermentés (yogourt, Kéfir) (De Vuyst et Degeest, 1999), ainsi que pour prévenir la synérèse (exsudation de lactosérum) (Hartley et Denariáz, 1993 ; Cerning, 1990 et 1994 ; Nakajima, 1995).

Puisque les bactéries lactiques sont considérées "GRAS" (« Generally Recognized As Safe »), les EPS produits par ces souches peuvent aussi l'être (Kleerebezem *et al.*, 1999).

Chapître 3

Le système immunitaire¹

3.1 Description

L'organisme se protège des intrus, tout d'abord, grâce à des barrières naturelles constituées par la peau et les muqueuses (gastro-intestinale, respiratoires, génito-urinaire). Ces dernières doivent leurs effets protecteurs à certains composés chimiques simples (HCl gastrique), certaines protéines (mucus) ou enzymes (lysozymes) (Dawson, 1991). Lorsque ces barrières présentent des brèches, un autre mécanisme entre en jeu : le système immunitaire. Celui-ci comprend des organes répartis dans tout l'organisme, tels que : moelle osseuse, thymus, rate, plaques de Peyer et ganglions lymphatiques. Les cellules de ce système sont les leucocytes, ou globules blancs qui se subdivisent eux-mêmes en deux principales catégories. Tout d'abord, les phagocytes dont le mode d'action consiste principalement en la phagocytose, sont responsables de l'immunité dite "non-spécifique" ou "non-adaptative". Les phagocytes comprennent les monocytes, macrophages, neutrophiles, mastocytes (Cavaillon, 1993). D'autre part, les lymphocytes sont responsables de l'immunité dite "spécifique" ou "adaptative" (Perdigon *et al.*, 1995).

3.2 Phagocytes et réponse non-adaptative

Les macrophages sont équipés de plusieurs récepteurs qui leurs permettent de reconnaître des constituants microbiens, comme les hydrates de carbones et lipopolysaccharides bactériens. Une fois liés, les micro-organismes sont engloutis, puis dégradés dans les endosomes et lysosomes, ce qui génère des peptides qui peuvent être présentés avec des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité sur la surface du macrophage. La réponse non-adaptative, survenant très tôt, permet de mettre le pathogène en "garde à

¹ 1. Les notions décrites dans ce chapitre sont inspirées des manuels de Kuby (1997) et de Janeway et Travers (1997), à moins d'indication contraire.

vue" pendant que s'organise la réponse adaptative qui nécessite une période plus longue pour se préparer.

Le but de cette réponse immunitaire innée est de recruter le plus grand nombre de cellules phagocytaires et effectrices au site de l'infection à travers la sécrétion d'une panoplie de cytokines et d'autres médiateurs inflammatoires. Les effets de tous ces médiateurs provoquent une réaction locale immédiate au site de l'infection, aussi appelée réaction inflammatoire, et qui se caractérise par la douleur, la rougeur, la chaleur et l'enflure.

Au début de la réponse inflammatoire, les phagocytes libèrent plusieurs protéines comme les enzymes activatrices du plasminogène et les phospholipases. Ces médiateurs provoquent la libération d'autres substances, formant ainsi une boucle d'amplification. Dans un deuxième temps, ces signaux d'activation précoces sont pris en relais par les cytokines libérées par les leucocytes et les cellules endothéliales activées. La synthèse des cytokines est induite par des résidus bactériens et/ou des fragments de clivage du complément, notamment les fragments C3a et C5a (Haeflner-Cavaillon et Cavaillon, 1993). Ces fragments sont des activateurs des cellules pro-inflammatoires et phagocytaires, qui vont à leur tour sécréter certaines cytokines, notamment l'IL-1 et le TNF- α , qui exercent des activités pro-coagulantes et pro-inflammatoires. De plus, le fragment C5a est capable d'activer les mastocytes, favorisant la libération du contenu de leurs granules, soit l'histamine, la sérotonine et le LTB₄ (Haeflner-Cavaillon et Cavaillon, 1993). Ces substances contribuent aux changements qui se produisent dans les cellules endothéliales au site de l'infection : augmentation du diamètre des vaisseaux sanguins et expression de molécules d'adhésion qui se lient sur la surface des monocytes et neutrophiles circulants et qui augmentent leur migration des vaisseaux vers les tissus (perméabilité). Certains facteurs de coagulation sanguins (XII et de Hageman) provoquent la dilatation des vaisseaux et la contraction des muscles lisses (Haeflner-Cavaillon et Cavaillon, 1993).

D'autre part, une activité anti-inflammatoire se développe par l'entremise de l'IL-4 et de l'IL-10. Ces derniers vont inhiber la production d'IL-1 et de TNF par les

monocytes/macrophages activés. Cette action anti-inflammatoire se traduit soit par une diminution des récepteurs spécifiques des cytokines pro-inflammatoires, soit par la libération d'inhibiteurs spécifiques, par exemple l'IL-1ra (receptor antagonist) et la forme soluble du récepteur du TNF- α (Haeffner-Cavaillon et Cavaillon, 1993).

La réaction inflammatoire vise donc l'élimination de particules étrangères et son ampleur dépend de l'équilibre entre la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires. Lorsque la réponse est adéquatement régulée, il en résulte l'élimination du corps étranger sans aucun dommage pour l'organisme (Haeffner-Cavaillon et Cavaillon, 1993). Dans le cas contraire, lorsque les effets du TNF- α ne peuvent contenir l'infection localement et que celle-ci se propage avec le courant sanguin, les conséquences peuvent être catastrophiques. Cette condition se nomme choc septique et s'accompagne d'une libération de TNF- α par les macrophages dans le foie, la rate et d'autres organes. Il se produit une réaction généralisée de coagulation dans les petits vaisseaux et il s'ensuit des lésions au foie, reins, cœur et poumons pouvant provoquer la mort.

Les cytokines produites par les macrophages et neutrophiles sont aussi à l'origine de la réponse de phase aiguë (acute phase response). Cette réponse se caractérise par l'élévation de la température sous l'action de l'IL-1, de l'IL-6 et du TNF- α , aussi appelés pyrogènes endogènes parce qu'ils proviennent d'une source endogène plutôt que d'un composant bactérien. La fièvre est généralement bénéfique pour l'hôte, car la plupart des pathogènes ont de la difficulté à croître à des températures élevées et la réponse adaptative est plus intense à une température plus élevée.

3.3 Lymphocytes et réponse adaptative

Plusieurs micro-organismes qui pénètrent dans le corps sont aussitôt engloutis et détruits par les phagocytes formant la première ligne de défense, non-spécifique. Cependant, les pathogènes ont réussi à développer des mécanismes qui leur permettent de contourner ces mécanismes innés de défense. La reconnaissance et l'élimination de ces micro-organismes pathogènes sont par conséquent pris en charge par la réponse adaptative.

Il existe deux types de lymphocytes, appelés aussi cellules B et T. Les lymphocytes B se différencient dans la moelle osseuse rouge des os longs. Ils se subdivisent aussi en deux sous-populations. La première, représentant 15%, se caractérise par le marqueur CD5+ et se retrouve dans la cavité péritonéale. La seconde, représentant 85%, se retrouve dans le sang et dans tous les organes du système immunitaire (Perdigon *et al.*, 1995). Les lymphocytes B sont des cellules présentatrices d'antigènes très efficaces, grâce à la densité élevée de molécules de classe II (CMH II) sur leur surface. Contrairement aux autres cellules présentatrices d'antigènes, les lymphocytes B sont spécifiques à un antigène donné (Dawson, 1991).

Les lymphocytes T, quant à eux, se différencient dans le thymus et comprennent les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) caractérisés par le marqueur CD8+, ainsi que les lymphocytes T auxiliaires (Th) caractérisés par le marqueur CD4+. De plus, les lymphocytes T auxiliaires se subdivisent en Th1, Th2 ou Th0, selon les produits sécrétés (Perdigon *et al.*, 1995 ; Romagnani, 1996). Les lymphocytes T naïfs, Th0, sont des cellules non spécialisées qui peuvent prendre l'orientation Th1 ou Th2 (figure 2). L'orientation de la réponse est déterminée par l'environnement de cytokines présent lors de l'activation par l'antigène. Ainsi, la présence d'IL-4 favorise une réponse de type Th2, tandis que la présence d'IL-12, en synergie ou non avec l'IFN- γ , favorise une réponse de type Th1 (Wu *et al.*, 1993 ; Wenner *et al.*, 1996). Les cellules Th1 favorisent la production d'anticorps d'opsonisation et de fixation du complément, l'activation des macrophages, la cytotoxicité anticorps-dépendante et l'hypersensibilité de type retardé (Romagnani, 1996). Les cellules Th1, activées par un antigène de nature particulière ou de haut poids moléculaire, produisent entre autres l'IFN- γ (Hayglass et Stefura, 1991). La réponse de type Th1 assure une protection anti-parasitaire, antivirale et bactéricide. D'autre part, les cellules Th2 produisent une panoplie d'interleukines (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 et IL-13). Les cellules Th2 sont d'une grande utilité lors des réponses humorales en favorisant la différenciation et la synthèse d'anticorps, aussi appelés immunoglobulines, par les lymphocytes B. Les cellules Th2 sont généralement activées par un antigène sous forme soluble (Romagnani, 1996 ; Hayglass et Stefura, 1991). Les cellules Th2, par leur effet antagoniste sur les cytokines du profil Th1, exercent aussi une

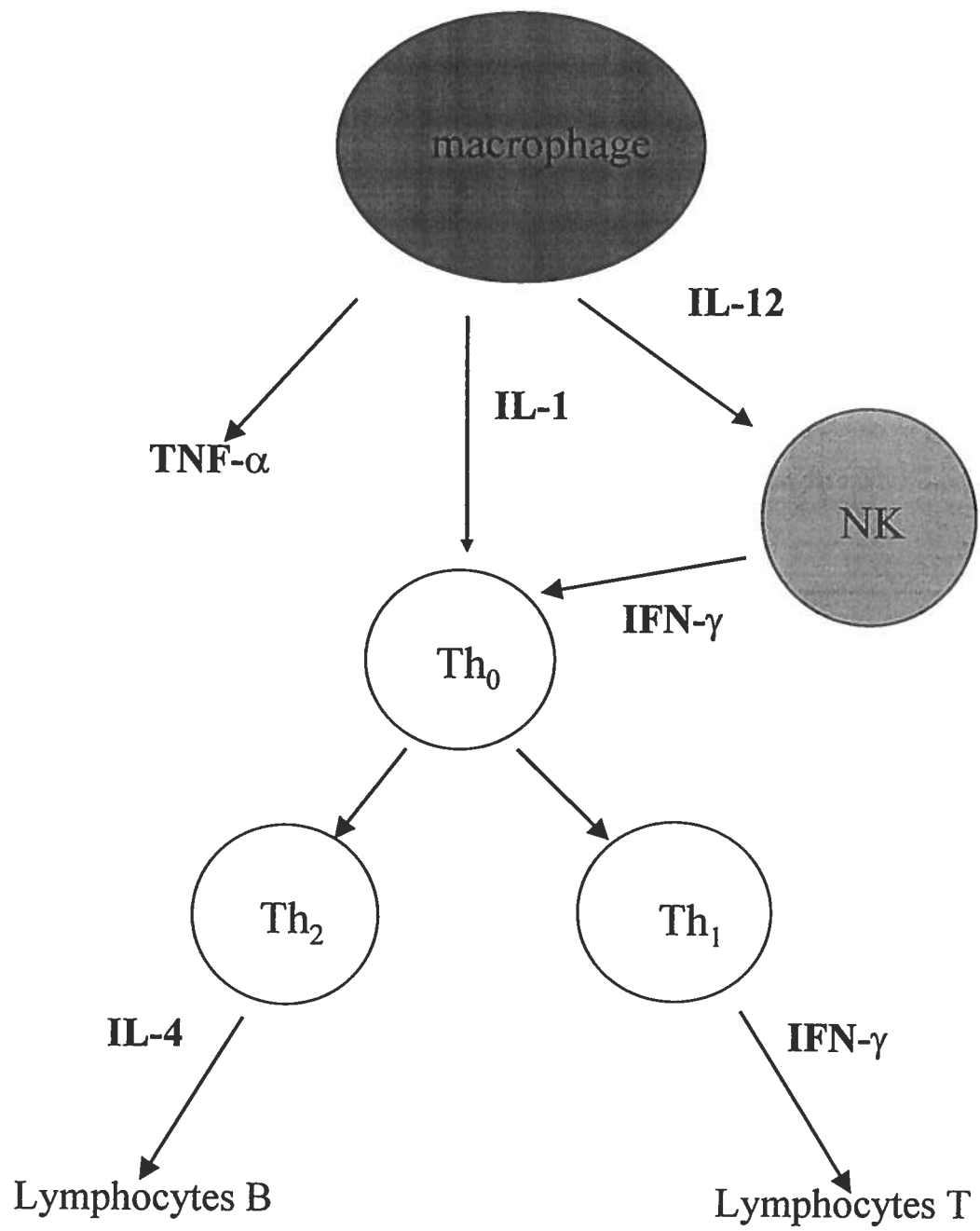
activité anti-allergique (Shida *et al.*, 1998 ; Murosaki *et al.*, 1998). D'autres sous-populations de lymphocytes T existent dans l'organisme, mais leur localisation est très limitée. Ainsi, la sous-population Th3 est générée dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT). Ce sont des cellules T régulatrices qui sont impliquées dans le phénomène de tolérance orale en inhibant les réponses Th1 et Th2 (Dugas *et al.*, 1999).

Le système immunitaire a besoin d'expériences immunologiques diverses pour se développer et fonctionner de façon adéquate. Ainsi, les différents antigènes présents dans l'environnement contribuent à fournir des stimuli équilibrés (Th1 et Th2). Dugas *et al.* (1999) pointent du doigt la vaccination moderne et les conditions de vie "trop propres" qui prévalent dans les pays occidentaux comme responsables de l'augmentation des atopies (allergies et maladies auto-immune) dans ces régions. En prenant pour exemple un modèle animal, ils expliquent comment les vaccins actuels stimulent surtout des réponses de type Th2, sans fournir de stimulus Th1, comme il se produit lors de la guérison naturelle de plusieurs maladies d'enfance, telles les oreillons. Le système immunitaire se voit ainsi privé d'une expérience d'apprentissage. Les conditions de propreté dans lesquelles nous vivons limitent aussi les occasions d'apprentissage du système immunitaire. Ces deux facteurs seraient ainsi responsables de deux "syndromes" que les auteurs nomment "syndrome de déséquilibre des cytokines" et "syndrome de régulation non-éduquée des cellules T".

Une autre population de lymphocytes granulaires, dite non-T non-B, les cellules tueuses naturelles (NK) représentent environ 5-10% des lymphocytes circulant (Cavaillon, 1993). Elles sont constitutivement cytotoxiques et combattent les cellules infectées par des virus, les bactéries intracellulaires et les tumeurs, grâce à des substances (perforine et granzymes) contenues dans les granules de leur cytoplasme. La réponse effectuée par les NK ne génère pas de mémoire immunologique.

Figure 2. Schéma des principales interactions entre différentes cytokines et leur implication dans la différenciation des lymphocytes T auxiliaires naïfs(Th0)

Le macrophage activé produit d'abord du $\text{TNF-}\alpha$, puis de l'IL-1 qui stimule la différenciation des lymphocytes T auxiliaires naïfs (Th0) et enfin, de l'IL-12 qui stimule la prolifération des cellules NK. Ces dernières vont sécréter de l'IFN- γ , qui va aussi stimuler la différenciation des Th0. Dépendamment de l'environnement de cytokines présent, les Th0 pourront prendre soit une orientation Th1 (en présence d'IL-12), soit une orientation Th2 (en présence d'IL-4).



Le premier contact entre les cellules T naïves et l'antigène porté par une cellule présentatrice d'antigène induit une réponse primaire et génère une mémoire immunologique. C'est la réponse cellulaire qui se développe lors d'une orientation de type Th1. L'activation des cellules T naïves mène à la production de lymphocytes T effecteurs armés. Cette activation nécessite la reconnaissance d'un fragment de peptide étranger lié à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), ainsi qu'un signal de co-stimulation par une cellule présentatrice d'antigène. Il existe trois types de cellules présentatrices d'antigènes spécialisées, qui se trouvent dans les organes lymphoïdes périphériques, ce sont les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules B. Une fois armées, les cellules effectrices produisent deux types de molécules effectrices, ce sont les cytotoxines, qui sont entreposées dans les granules des CD8, et les cytokines qui sont synthétisées *de novo* par toutes les cellules T effectrices et qui sont les principaux médiateurs des actions des CD4.

L'orientation de type Th2 amène la réponse humorale. Adaptée aux pathogènes extracellulaires, elle s'effectue grâce à des anticorps spécifiques à des déterminants antigéniques (épitopes) sur le pathogène. Les lymphocytes B sont adaptés uniquement pour se lier à des molécules solubles spécifiques, grâce à leur immunoglobuline. Ils internalisent les antigènes solubles liés à leur récepteur immunoglobuline et fournissent des fragments de peptide de ces antigènes sous forme de complexe peptide/CMH. Ce modèle de présentation permet aux cellules B d'être ciblées par des lymphocytes T CD4 antigène-spécifiques. De plus, certaines cellules cytotoxiques (NK, macrophages, neutrophiles, éosinophiles) expriment sur leur membrane des récepteurs spécifiques à la partie Fc de l'anticorps. Lorsqu'un anticorps est lié à sa cellule-cible, ces cellules cytotoxiques se lient à l'anticorps, et par le fait même à la cellule-cible et causent la lyse cellulaire.

Les anticorps possèdent plusieurs fonctions effectrices qui facilitent l'élimination du pathogène : activation du complément, rôle d'opsonines qui augmentent la phagocytose, neutralisation de toxines bactériennes, liaison à des pathogènes potentiels à la surface des

muqueuses afin d'empêcher la colonisation, liaison aux récepteurs Fc des NK ou des macrophages.

Lors d'un premier contact avec un antigène, il se produit une réponse primaire caractérisée par la production de cellules plasmiques sécrétrices d'anticorps et de cellules B mémoire. Il se produit d'abord une période de latence durant laquelle les cellules B naïves se différencient, suivi d'une période exponentielle de croissance, jusqu'à l'atteinte d'un plateau de durée variable, puis d'un déclin. Lors d'une réponse primaire, les cellules sécrétrices produisent des anticorps (d'abord les IgM, puis les IgG), ensuite certaines de ces cellules deviennent des cellules mémoire. Lors d'une exposition subséquente au même antigène, les cellules-mémoire formées s'activent lorsque l'antigène leur est présenté et elles sont en mesure de l'éliminer plus rapidement et plus efficacement.

3.4 Immunité intestinale

La muqueuse intestinale est constituée d'une simple couche de cellules épithéliales polarisées qui sépare les antigènes (aliments, bactéries) des tissus lymphoïdes sous-jacents (Hershberg et Mayer, 2000). Ces tissus lymphoïdes appelés GALT pour « Gut Associated Lymphoid Tissues » incluent les plaques de Peyer, et sont recouverts d'un épithélium contenant une forte proportion de cellules M, qui sont perméables aux composantes du lumen et qui permettent une interaction avec les cellules immunitaires sous-jacentes (Schiffrin *et al.*, 1995).

Les cellules épithéliales intestinales (CEI) sécrètent de l'IL-6 et du TGF- β , qui peuvent agir sur les lymphocytes B de la lamina propria et réguler localement la sécrétion d'anticorps. La nature de cette régulation dépend de l'état de la muqueuse (saine, enflammée ou infectée) (Goodrich et McGee, 1998). De plus, les CEI sont en contact étroit avec des lymphocytes T intra-épithéliaux, et aussi, grâce à des projections basolatérales à travers la membrane basale semi-poreuse, avec une autre population distincte de lymphocytes T de la lamina propria (figure 3). Certains auteurs ont émis l'hypothèse que les CEI agiraient en tant que cellules présentatrices d'antigènes non conventionnelles.

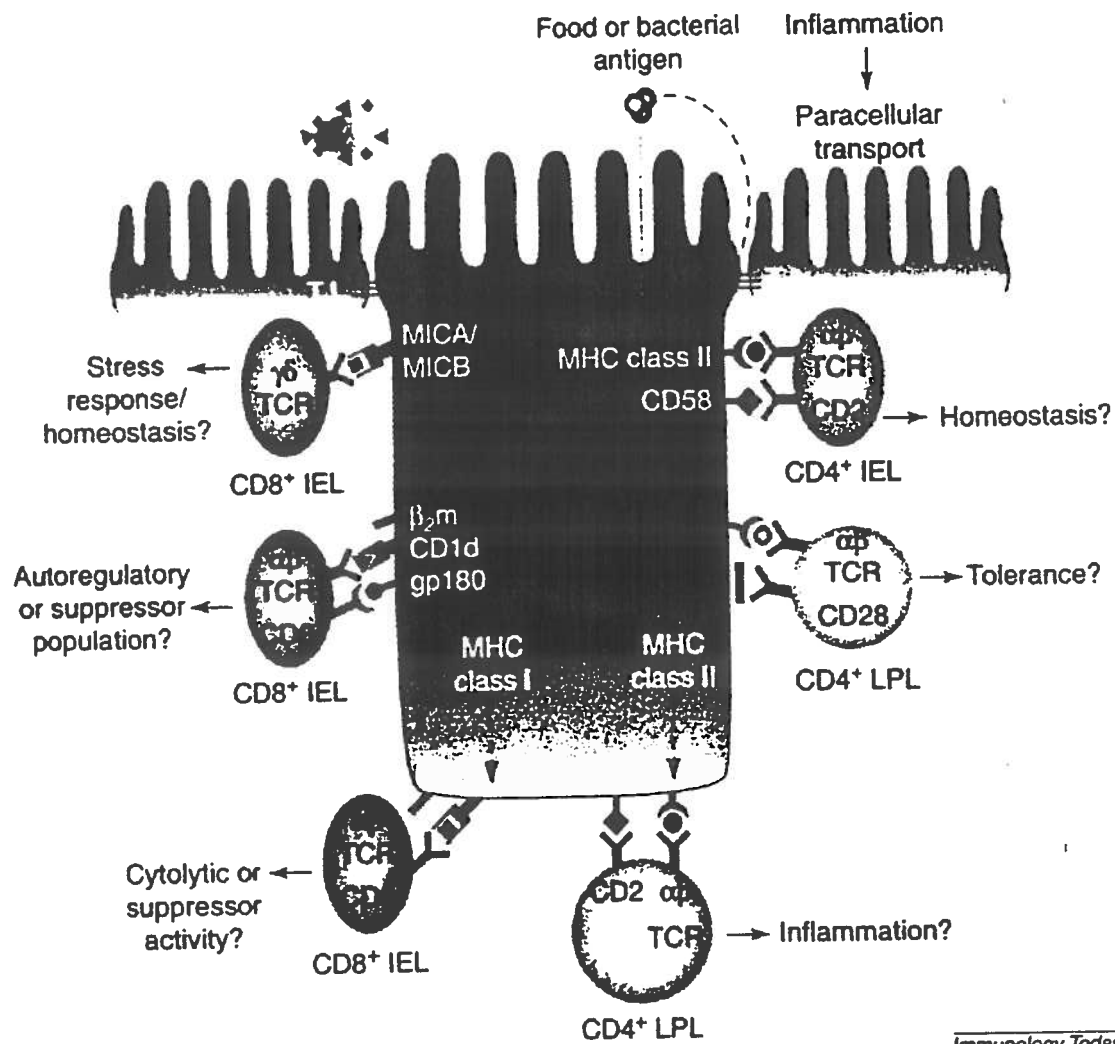
On a longtemps pensé que les capacités d'absorption des entérocytes étaient limitées à de petits peptides et des solutés. Il y a maintenant de plus en plus de preuves qu'ils peuvent transloquer des protéines intactes et même des micro-organismes (Kaiserlian et Etchart, 1999 ; Hershberg et Mayer, 2000). Cependant, la présence de la couche de mucus et du glycocalyx, favorise la prise en charge des antigènes par les cellules M, au détriment des CEI. Les cellules M, situées dans les dômes surplombant les plaques de Peyer, sont hautement spécialisées dans le transport des macromolécules (Hershberg et Mayer, 2000). Les cellules dendritiques (CD), quant à elles, se retrouvent principalement dans les plaques de Peyer. Les cellules dendritiques sont capables d'activer les lymphocytes T naïfs. De plus, leur biologie suggère qu'elles sont capables de capturer un antigène directement du lumen, qu'elles peuvent avoir accès directement à lamina propria et qu'elles peuvent migrer vers des nodules lymphoïdes distants (Kaiserlian et Etchart, 1999).

De façon naturelle, les bactéries lactiques de la flore intestinale stimulent continuellement le système immunitaire à produire de petites quantités de plusieurs cytokines, ce qui garde le système immunitaire dans un état d'alerte perpétuelle, en prévision d'une invasion potentielle d'un pathogène (Solis-Pereyra *et al.*, 1997). En fait, la microflore est essentielle à la stimulation de l'immunité mucosale et à l'amplification des cellules immunocompétentes (Holzapfel *et al.*, 1998). Ainsi, de petites quantités de produits bactériens (peptidoglycan, lipopolysaccharide) provenant des bactéries indigènes de la flore seraient nécessaires au développement, à la maintenance et au bon fonctionnement du système immunitaire (Hamann *et al.*, 1998). C'est ce qui explique pourquoi les animaux axéniques sont plus susceptibles aux maladies (Fuller, 1989). La microflore intestinale normale, composée d'une grande variété de bactéries, ne cause habituellement aucune réponse inflammatoire de la muqueuse intestinale chez son hôte (Kimura *et al.*, 1997). Toutefois certains facteurs bouleversent la nature profonde de cette microflore. Ce sont particulièrement la diminution de l'allaitement maternel, la consommation d'aliments raffinés et de sucres artificiels et la prise intermittente d'antibiotiques. Selon

Rook et Stanford (1998), ces facteurs, ainsi que la vaccination stimulant les réponses Th2 ont changé le patron évolutif normal du système immunitaire.

Figure 3. Modèle proposé pour les interactions complexes entre les cellules épithéliales intestinales et les cellules T de la muqueuse intestinale, soit les lymphocytes intestinaux intraépithéliaux (IEL) et les lymphocytes de la lamina propria (LPL)

À gauche de la cellule, les interactions des IEL CD8+ avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe Ib, MICA/MICB et la forme de CD1D associée à la β_2 -microglobuline (β_2m). Dans tous les cas, des antigènes non-peptidiques dérivés d'une bactérie luminale (triangles et carrés) sont présentés à des populations non-polymorphiques de lymphocytes T possédant le récepteur $\gamma\delta$ ou $\alpha\beta$. À droite de la cellule, les interactions potentielles des IEC avec les sous-populations de lymphocytes T CD4+ via HLA de classe II sont représentées. (Tiré de Hershberg et Mayer, 2000, Immunology Today, vol. 21, p. 126).



3.5 Récepteurs des cellules immunitaires reconnaissant les bactéries

Certaines structures bactériennes peuvent être une cible pour la reconnaissance par les macrophages. Les lipopolysaccharides, peptidoglycans et acides lipoteichoïques microbiens ont la capacité de se lier au même récepteur, CD14 (Hamann *et al.*, 1998 ; Weidemann *et al.*, 1994). CD14 est un récepteur du LPS, mais des bactéries Gram+ (donc dépourvues de LPS) peuvent être reconnues grâce à une co-expression des récepteurs CD14 et TLR2 (Yoshimura *et al.*, 1999). Cette reconnaissance aurait lieu en partie via le squelette de peptidoglycan. D'autres auteurs (Weidemann *et al.*, 1997), croient plutôt que le peptidoglycan soluble se lie directement à CD14.

TLR2, dont l'activité serait potentialisée par CD14, pourrait reconnaître des ligands bactériens sur la paroi des bactéries Gram positives qui partagent des similarités avec le LPS (Yoshimura *et al.*, 1999). Parmi les ligands les plus connus du TLR2, se trouvent les peptidoglycans et les acides lipoteichoïques (Schwandner *et al.*, 1999). Le LPS, quant à lui, est un ligand du TLR-4 (Takeuchi *et al.*, 1999 ; Tapping *et al.*, 2000). Les acides lipoteichiques seraient également des ligands pour les "scavenger receptors (SR)" et interviennent dans la liaison de ce récepteur à la bactérie Gram positive (Dunne *et al.*, 1994). Les SR de type A (SR-A) "vidangent" le LPS, ce qui a pour conséquence de réduire la libération des cytokines pro-inflammatoires (Haworth *et al.*, 1997). Enfin, les SR-A jouent un rôle de médiateur dans la phagocytose, tant dépendante qu'indépendante de l'opsonine, des bactéries Gram positives (Thomas *et al.*, 2000).

Un autre récepteur des macrophages, celui du mannose, se lie aux ligands polymannose des bactéries (lipoglycan, glycoprotéines), permettant ainsi leur transport vers des endosomes spécialisés menant à la présentation de l'antigène par CD1b (Prigozy *et al.*, 1997). Le récepteur du mannose est une lectine de type C, exprimée surtout par les macrophages et les cellules dendritiques possédant une très grande affinité pour les oligosaccharides présents à la surface des bactéries (Giaimis *et al.*, 1993 ; Prigozy *et al.*, 1997). La levure *Saccharomyces cerevisiae*, dont la paroi cellulaire est composée de mannose et de glucan, est phagocytée par les macrophages par l'intermédiaire des récepteurs du mannose et du β -glucan (Giaimis *et al.*, 1993). Le β -glucan de *S.*

cerevisiae est également un activateur potentiel du récepteur CR3, exprimé par les cellules phagocytaires, par les cellules NK, ainsi que par certaines sous-populations de lymphocytes B et T ; l'état d'activation de ce récepteur permet la phagocytose des cellules exprimant iC3b par les neutrophiles, ou encore favorise la cytotoxicité des cellules NK face aux tumeurs exprimant iC3b (qui seraient normalement résistantes aux NK) (Ross et Vetvicka, 1993 ; Vetvicka *et al.*, 1996). Une séquence spécifique du polysaccharide capsulaire de *Klebsiella pneumoniae* est reconnue par le récepteur du mannose et opsonisée par une lectine du surfactant pulmonaire (Keisari *et al.*, 1997). D'autres lectines, comme la protéine C-réactive et la protéine de liaison du mannose se combinent à la fois aux hydrates de carbone de micro-organismes et à des récepteurs spéciaux des phagocytes, et participent à l'opsonisation (Keisari *et al.*, 1997). Un autre récepteur, chez les cellules tueuses naturelles (NK), Ly-49A possède un domaine de reconnaissance des hydrates de carbone qui reconnaît une structure hexose 6-sulphate, la sulfatation étant nécessaire à la liaison (Daniels *et al.*, 1994). Snapper et Mond (1996) ont proposé un modèle d'induction de la sécrétion d'immunoglobuline, indépendante des lymphocytes T et spécifique aux polysaccharides. Ainsi, les antigènes T-indépendants contenus dans les polysaccharides bactériens, mais aussi les capsides virales et les auto-antigènes, seraient en mesure de stimuler la sécrétion d'immunoglobuline. Cette voie nécessite une action concertée de diverses fractions activatrices de cellules B contenues dans le micro-organisme d'une part, et de cytokines produites par des cellules non-T, notamment les NK, d'autre part.

3.6 Les cytokines

Les cytokines sont des protéines sécrétées de faible poids moléculaire servant de médiateurs entre les différentes cellules du système immunitaire. Elles sont impliquées dans la régulation du développement des cellules effectrices, et certaines cytokines possèdent elles-mêmes des fonctions effectrices. Leur action est généralement locale, axée sur une cellule cible possédant des récepteurs de très grande affinité pour une cytokine donnée. Cette cellule cible peut être la cellule qui sécrète la cytokine, (action autocrine), une cellule à proximité de la cellule productrice (action paracrine), ou dans quelques cas, une cellule distante (action endocrine).

3.6.1 TNF

Le TNF, aussi appelé TNF- α ou cachectine, est sécrété majoritairement par les macrophages activés et les mastocytes. Ses inhibiteurs naturels sont les formes solubles des récepteurs du TNF (TNFR-1 et TNFR-2), qui sont constituées des domaines extracellulaires des formes membranaires (Nophar *et al.*, 1990). L'activité du TNF est principalement cytotoxique sur les cellules tumorales, cette action résultant en la lyse de la cellule cible, soit par des mécanismes nécrosants, soit par des mécanismes d'apoptose (Cavaillon, 1993). D'autres cytokines, comme l'IFN- γ amplifient les effets cytotoxiques du TNF. Le TNF possède de nombreuses activités pro-inflammatoires, grâce à l'induction de plusieurs médiateurs (épinéphrine, leukotriènes, prostaglandines E₂). Par exemple, le TNF agit sur l'hypothalamus ; il induit ainsi la fièvre via la production des PGE₂ (prostaglandines E₂) et de l'IL-1 (Dinarello *et al.*, 1986 ; Cavaillon, 1993). Il favorise aussi la coagulation en entraînant une hyper-perméabilité des vaisseaux sanguins (Cavaillon, 1993).

En somme, la présence du TNF est favorable au site même de l'infection pour assurer une réponse inflammatoire locale, si cette action est assez brève. Si cette action est prolongée, cependant, elle peut mener à des complications pathologiques (arthrite, irritation du colon, etc.). De même, si ses nombreux effets s'étendent sur l'ensemble de l'organisme, une trop grande quantité de TNF peut être nocive. Ainsi, le TNF est impliqué dans le choc septique qui peut être mortel. De nombreux constituants de la paroi cellulaire des bactéries Gram+ (exotoxines, peptidoglycan, acides lipoteichoïques, polysaccharides) sont capables d'induire la production de TNF par les macrophages, de la même façon que le ferait le LPS chez les bactéries Gram négatives (Cavaillon, 1993 ; Henderson et Wilson, 1996).

3.6.2 IL-12

L'IL-12 bioactive est un hétérodimère constitué de deux sous-unités, p35 et p40, reliées par un pont disulfure (Heinzel *et al.*, 1997). La production de ces deux sous-unités est

régulée différemment, et le niveau d'expression de la p35 est limitant pour déterminer le niveau d'IL-12 bioactive (Snijders *et al.*, 1996). La production d'IL-12 par les macrophages est dépendante de l'IFN- γ et du TNF (Flesch *et al.*, 1995). Le TNF peut réguler à la baisse l'expression du gène de l'IL-12 (Ma *et al.*, 2000). L'IL-12 induit également la production d'INF- γ par les lymphocytes. Seule, l'IL-12 n'a aucun effet mitogène sur les lymphocytes au repos, mais en synergie avec l'IL-2, elle stimule la prolifération des cellules tueuses naturelles (NK) et induit la différenciation des lymphocytes cytotoxiques (CTL) (Mecheri, 1993). En synergie avec l'IFN- γ , elle participe au développement optimal d'une réponse de type Th1 (Bradley *et al.*, 1996). Une certaine autorégulation se produit grâce à la production d'homodimères de p40 fonctionnant comme antagonistes de l'IL-12 bioactive (Heinzel *et al.*, 1997). L'IL-12 favorise le développement d'une réponse de type Th1 et inhibe les réponses Th2 et la production d'IgE (McKnight *et al.*, 1994 ; Skeen *et al.*, 1996 ; Shida *et al.*, 1998 ; Murosaki *et al.*, 1998). Ces IgE sont impliquées dans plusieurs allergies ; elles sont produites par exemple en réaction à un antigène alimentaire, particulièrement de nature protéique (Moon et Kleinman, 1995).

3.6.3 IFN- γ

L'IFN- γ , sécrété par les lymphocytes Th1 et par les cellules NK, joue un rôle dans l'élimination des bactéries et parasites (Charley et La Bonnardière, 1993). Sous son action, les cellules non infectées deviennent résistantes aux infections virales, dû à l'activation de certains systèmes enzymatiques empêchant la synthèse des protéines virales ou bloquant certaines phases du cycle viral (Young et Hardy, 1990). Il existe une synergie entre l'IFN- γ et le TNF, car l'IFN- γ augmente l'expression des récepteurs intracellulaires du TNF (Charley et La Bonnardière, 1993). Dans la rate, l'expression des ARN messagers de iNOS induite par le LPS est indépendante de la signalisation médiée par le TNFR-1, mais est dépendante du macrophage et/ou de ses produits de sécrétion, et de l'IFN- γ (Salkowski *et al.*, 1997). De plus, l'IFN- γ inhibe la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10 (Donckier *et al.*, 1994 ; Erb *et al.*, 1998 ; Shida *et al.*, 1998). L'IFN- γ est aussi un médiateur important dans l'hypersensibilité de type retardée.

3.6.4 IL-4

Cette cytokine est sécrétée par les basophiles et par la sous-population Th2 de lymphocytes T (Dawson, 1991 ; Gougeon, 1993). L'IL-4 favorise la prolifération des NK et des cellules B, la maturation des thymocytes et la prolifération des lymphocytes T matures (Banchereau, 1993). Il stimule aussi le développement de la production des IgE par les lymphocytes B (Tepper *et al.*, 1992), et de ce fait, favorise les phénomènes allergiques.

3.7 Modulation de la production de cytokines

3.7.1 Par des bactéries

Plusieurs études ont porté sur la stimulation de la production de cytokines par des cellules immunitaires en présence de bactéries entières, vivantes ou mortes. Selon Song *et al.* (1996), des cellules de *Listeria monocytogenes* tuées à la chaleur induisent une production d'IL-10 par des cellules spléniques naïves, et inhibent la production d'IFN- γ en bloquant la production d'IL-12 par les macrophages, tandis que les mêmes cellules de *L. monocytogenes* viables induisent la sécrétion d'IFN- γ en stimulant la production d'IL-12 par les macrophages. Dans le cas des bactéries lactiques, les lactobacilles de la microflore sont en mesure d'induire l'IL-18 et pourraient jouer rôle important dans l'immunité mucoale de l'intestin (Miettinen *et al.*, 1998 ; Kohno et Kurimoto, 1998). Diverses souches de lactobacilles stimulent la production d'IFN- γ , de NO et d'IL-12 (Tejada-Simon *et al.*, 1999 ; Miettinen *et al.*, 1998), de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-5 (Marin *et al.*, 1997b). *Lb. casei* a été très étudié pour ses propriétés probiotiques et immunostimulantes. Il induit la production d'IL-1 β , de TNF- α , d'IFN- γ et d'IL-12 (Yatsutake *et al.*, 1999), et cette sécrétion d'IL-12 bloque la production des IgE (Shida *et al.*, 1998 ; Yasui *et al.*, 1999). Des études ont également été réalisées avec des bifidobactéries. Celles-ci auraient vraisemblablement des propriétés mitogéniques et stimuleraient la production d'anticorps par les ganglions lymphatiques (Lee, 1998). Des souches commerciales stimulent la production de TNF- α et d'IL-6 (Lee, 1998 ; Marin *et*

al., 1997a). *B. breve* augmente les titres d'anticorps contre les rotavirus et le virus de l'influenza chez la Souris (Yasui *et al.*, 1999).

3.7.2 Par des produits bactériens

En plus des bactéries entières, vivantes ou mortes, certains métabolites et produits bactériens possèdent la capacité de stimuler le système immunitaire. L'ADN bactérien de haut poids moléculaire (>20 000 pb) est capable de stimuler la prolifération des lymphocytes B (Messina *et al.*, 1991). Les toxines érythrogéniques produites par *Streptococcus pyogenes* stimulent la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules mononuclées du sang humain (PBMC) (Müller-Alouf *et al.*, 1994). Plusieurs polysaccharides bactériens, tels les lipopolysaccharides, les peptidoglycans, et les acides teichoïques, augmentent l'activité des macrophages (Keller *et al.*, 1994). Aussi, le LPS stimule la production de TNF et d'IL-6 par les entérocytes (Ogle *et al.*, 1997).

Les composantes de la paroi cellulaire des bactéries Gram positives (peptidoglycan et acide lipoteichoïque) peuvent contribuer au choc septique au même titre que le LPS chez les bactéries Gram négatives, dû à la stimulation des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-6 (Heumann *et al.*, 1994 ; Standiford *et al.*, 1994). Des peptidoglycans, probablement dérivés de la microflore intestinale, ont été isolés dans des tissus stériles (rate, foie) et représentent un potentiel d'induction de la production locale de cytokines pro-inflammatoires (Schrijver *et al.*, 1999). Le fait de trouver ces composés bactériens dans de tels tissus semble plutôt inusité, mais il y a des preuves que les peptidoglycans peuvent être absorbés par la paroi intestinale (Lichtman *et al.*, 1991). Ainsi, les peptidoglycan-polysaccharides (PG-PS) provenant des bactéries de la microflore et des pathogènes peuvent être transloqués et peuvent faire partie de l'étiologie des maladies inflammatoires chroniques (Stimpson *et al.*, 1986). Tous les individus y sont exposés, mais leur susceptibilité est reliée à l'efficacité de disposer des débris bactériens, au réseau de cytokines et aux fonctions des cellules immunitaires (Schwab, 1993). D'autre part, les acides teichoïques ont la capacité d'induire la formation d'IL-12 et le développement de type Th1 des cellules T CD4 par un mécanisme dépendant de l'IL-12 (Cleveland *et al.*, 1996). Pour sa part, un acide lipoteichoïque de *Staphylococcus aureus* induit directement

la production d'IL-8 (Standiford *et al.*, 1994). Enfin, le cytoplasme de *Lb. acidophilus* favorise le développement d'anticorps spécifiques et la prolifération des cellules des plaques de Peyer (Takahashi *et al.*, 1993)

Plusieurs EPS sont des antigènes T-indépendants. En effet, à cause de leurs longues structures répétitives, ils peuvent directement interagir et activer les lymphocytes B, sans stimuler les lymphocytes T; il y a donc peu de cellules mémoires formées et un contact subséquent avec ce même antigène peut ne pas provoquer de réponse mémoire (Weiner *et al.*, 1995). Plusieurs auteurs ont observé la stimulation des lymphocytes B par des EPS. Ainsi, le phosphopolysaccharide de *Lc. lactis* ssp. *cremoris* KVS20, isolé du viili, possède une activité mitogénique sur les lymphocytes B (Kitazawa *et al.*, 1993). Le dextran de poids moléculaire de 90 kDa ou plus induit une meilleure production d'anticorps que ceux de plus faible poids moléculaire (Kabat et Bezer, 1958). La mannoprotéine de *C. albicans* augmente la production d'IL-10 et d'IL-4 (Wang *et al.*, 1998 ; Li *et al.*, 1998). Bien que tous les polysaccharides mentionnés précédemment soient impliqués dans la réponse de type Th2, certains autres polysaccharides semblent être en mesure d'induire des cytokines de type Th1. C'est le cas du schizophyllan qui stimule la production d'IFN- γ et d'IL-12 (Sakagami *et al.*, 1988 ; Kakumu *et al.*, 1991).

2. Méthodologie

1. Milieux de culture

1.1 Croissance bactérienne

Le milieu MRS (Difco laboratories, Détroit, MI, USA) pour la croissance des lactobacilles a été préparé tel qu'indiqué par le manufacturier. Neuf mL de milieu liquide ont été répartis dans des tubes à bouchon vissé, puis les tubes ont été autoclavés, refroidis, puis conservés à 4 °C jusqu'à leur utilisation. Les géloses MRS ont été préparées à partir du bouillon MRS. Le bouillon a été préparé tel que mentionné ci-dessus et des flocons d'agar ont été ajoutés à raison de 10 g/L avant de porter le tout au point d'ébullition. Après stérilisation à l'autoclave, environ 15 mL de préparation d'agar ont été versés dans des boîtes de pétri, avant que le milieu ne se solidifie. Une fois refroidis, les géloses furent conservées au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation.

1.2 Production des EPS

En ce qui concerne la production des EPS en fermenteurs par la souche *L. rhamnosus* RW-9595M, un milieu basal minimum (BMM) a été utilisé. Celui-ci contenait, pour chaque litre de milieu, 50 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$, 20 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6 g d'acétate de sodium, 1 g de citrate d'ammonium dibasique, 3 g de KH_2PO_4 , 3 g de K_2HPO_4 , 500 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Chaque litre de milieu contenait également les acides aminés suivants : 200 mg de L-acide aspartique, de L-cystéine et de L-acide glutamique, ainsi que 100 mg de L-arginine, de L-isoleucine, de L-leucine, de L-lysine, de L-méthionine, de L-phénylalanine, de L-sérine, de L-thréonine, de L-tryptophane, de L-tyrosine et de L-valine. De plus, chaque litre contenait aussi 20 g de D-glucose, 1 mL de tween 80 et 1 mL de solution de vitamines (voir annexe 1). Tous ces produits provenaient de chez Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada). Les éléments ont été dissous sous agitation, puis le pH a été ajusté à 6,0. Le milieu a ensuite été autoclavé à 121 °C durant 15 minutes.

2. Micro-organismes

2.1 Souches bactériennes

La souche non-mucoïde, *L. rhamnosus* ATCC 9595 provient de l'American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). La souche mucoïde *Lb. rhamnosus* RW-9595M provient d'une culture de *Lb. rhamnosus* ATCC 9595 (Dupont *et al.*, 2000). Des solutions stock de ces souches ont été préparées dans du BHI (Difco laboratories, Détroit, MI, USA) contenant 15% de glycérol, puis entreposées à -80 °C.

2.2 Suivi de la croissance

Les souches congelées ont été dégelées à température ambiante, puis repiquées deux fois dans du bouillon MRS (1 mL : 9 mL de MRS), à 37 °C, pendant 18 h dans une jarre anaérobie (BBL Gas Pak System, Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA). Afin de suivre la croissance de chaque souche, 1 mL de pré-culture a été inoculé dans des tubes de MRS (9 mL). Les tubes ont été incubés en anaérobiose, à 37 °C. À divers intervalles de temps, deux échantillons ont été prélevés pour chaque souche. L'un de ces échantillons a servi à faire des dilutions en série 1/10 afin d'effectuer un comptage bactérien. Pour chaque dilution, 100 µL de suspension a été prélevée, puis étalée sur une gélose MRS. Les géloses ont ensuite été incubées à 37 °C, en anaérobiose, durant 48 h. Le nombre de colonies a ensuite été compté. Les données ont servi à tracer les courbes de croissance des bactéries (voir appendice B). Pour le second échantillon de 1 mL prélevé, la densité optique a été lue en spectrophotométrie (DMS 200 UV visible spectrophotometer, Varian, Sunnyvale, CA, USA), à 650 nm. Les données recueillies ont servi à tracer les courbes de croissance de chaque bactérie (voir appendice B). Le temps $t=6$ h, correspondant au début de la phase exponentielle de croissance, a été choisi comme durée d'incubation pour les préparations de bactéries destinées aux stimulations de splénocytes.

2.3 Détermination de la dose d'irradiation des bactéries

Des tubes de MRS ont été inoculés avec l'une des souches ATCC 9595 et RW-9595M, à une concentration de 5% ou 10%, puis incubés à 37 °C, en anaérobiose, durant 6 heures. Les tubes ont ensuite été irradiés au Centre d'Irradiation du Canada (Laval, QC, Canada), à 3, 5 ou 7 kGy, dans un "underwater calibrator" (UC-15A, MDS Nordion, Kanata, ON, Canada) ayant un débit de dose de 31,225 kGy/h. Des échantillons en duplicata ont été prélevés pour chaque concentration de bactéries, à chaque dose d'irradiation afin d'effectuer un comptage bactérien (voir appendice C). La dose minimale provoquant une inhibition de la croissance bactérienne est de 3 kGy. Cette dose a donc été retenue pour les irradiations des bactéries qui serviront aux stimulations de splénocytes. L'irradiation avait pour but de prévenir la croissance des bactéries dans le milieu lors des stimulations de splénocytes, tout en conservant l'intégrité des membranes, contrairement à l'inactivation par la chaleur (Solis-Pereyra *et al.*, 1997)

2.4 Préparation des bactéries en vue des stimulations de splénocytes

Chaque souche a été repiquée, cultivée à 37 °C en anaérobiose durant 6 h, puis les bactéries ont été irradiées à 3 kGy. Les bactéries irradiées ont ensuite été diluées dans une partie (v/v) de PBS, puis récoltées par centrifugation à température ambiante : à 520 × g, 15 min pour *Lb. rhamnosus* ATCC 9595, et à 9000 × g, 30 min pour *Lb. rhamnosus* RW-9595M. Les culots ont ensuite été lavés 3 fois dans du PBS, puis resuspendus dans du PBS afin d'obtenir une solution stock concentrée : 7×10^9 bactéries/mL pour *L. rhamnosus* RW-9595M, et 3×10^9 bactéries/mL pour *L. rhamnosus* ATCC 9595. Les solutions de bactéries, ainsi que les surnageants de culture ont été entreposés à -80 °C.

3. Exopolysaccharides (EPS)

3.1 Production des EPS

Lb. rhamnosus RW-9595M a été pré-cultivé comme précédemment, puis inoculé 1% v/v dans des fermenteurs (Biostat M, BBraun, Melsungen, Germany ; capacité 1,5 L) remplis de milieu BMM, pH 6,0. La production des EPS s'est déroulée à 37°C, pendant 24 h,

avec une agitation de 100 rpm. Le pH était ajusté de façon automatique à 6,0 à l'aide de NH_4OH 7N.

À la sortie des fermenteurs, le contenu a subi un traitement thermique en vue d'inactiver les glycohydrolases présentes dans le milieu de culture. Le contenu des fermenteurs a été réparti dans de petites bouteilles à serum (125 mL) qui ont été plongées dans de l'eau bouillante pendant 15 min. Le surnageant contenant les EPS a ensuite été récolté par centrifugation à $17\,700 \times g$ pendant 30 min, à 4°C et les bactéries ont été jetées.

3.2 Extraction et purification des EPS

Le surnageant a été encore une fois réparti dans des bouteilles à centrifuger de 500 mL, puis mélangé avec de l'éthanol 95% selon un rapport 1 : 3 (50 mL de surnageant de fermentation pour 150 mL d'éthanol 95%). Les bouteilles ont été entreposées à 4°C durant la nuit pour permettre aux EPS de précipiter. Ceux-ci furent alors récoltés par centrifugation à $14\,300 \times g$ durant 30 min, à 4°C. Le culot a été solubilisé dans de l'eau distillée, puis le tout a été dialysé contre de l'eau distillée pendant 24 heures, à 4°C, avec de fréquents changements d'eau, afin d'éliminer les sucres résiduels. La solution a ensuite été répartie dans des tubes 50 mL, puis lyophilisée.

L'extrait d'EPS a été purifié par trois lavages successifs à l'acide trichloracétique (TCA) 10%. Chaque lavage consistait en l'ajout de 6-8 mL/tube de TCA 10%, suivi d'une centrifugation à $4620 \times g$ pendant 15 min. La solution d'EPS fut encore une fois dialysée contre de l'eau distillée durant 5 jours à 4°C, en changeant fréquemment l'eau. Le tout a finalement été réparti de nouveau dans des tubes 50 mL, puis lyophilisé.

Afin de s'assurer de la pureté de la préparation d'EPS, le contenu en protéine a été mesuré par la méthode de Bradford (1976), à l'aide d'un réactif de coloration de protéine (Protein Assay Dye Reagent, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La concentration des EPS en solution était 5 mg/mL. Le standard utilisé était l'hémoglobine (Sigma, St-Louis, MO, USA ; concentration initiale 1 mg/mL) (voir appendice E).

3.3 Fractionnement

Une partie des EPS lyophilisés a été fractionnée par filtration à l'aide de membranes de différentes porosités. La solution d'EPS avait une concentration de 1,15 mg/mL et les passages sur membranes ont été réalisés avec une pression de 55-60 psi. La solution a d'abord été passée sur une membrane de porosité 1000 kDa (Omega OM990043, Pall Filtron, Calgary, AB, Canada). Le filtrat recueilli a ensuite été passé successivement sur des membranes de 100 kDa (Omega OM100043, Pall Filtron, Calgary, AB, Canada) et 10 kDa (Diaflo, PM10, Amicon, Beverly, MA, USA). Il résulte ainsi quatre fractions, séparées selon leur poids moléculaire : F1 : >1000 kDa ; F2 : 100-1000 kDa ; F3 : 10-100 kDa et F4 : <10 kDa. Chaque fraction a été répartie dans des tubes 50 mL, puis lyophilisée. Des solutions stock de 500 ng/mL de chacune des fractions ont été préparées, puis stérilisées avec un filtre 0,22 µm. Toutes les préparations d'EPS ont été conservées à -20°C.

3.4 Chromatographie

Le poids moléculaire des EPS a été déterminé en chromatographie d'exclusion de taille (GPC) à l'aide d'un HPLC (Vista 5500, Varian, Sunnyvale, CA, USA) couplé à un échantillonneur (Autosampler, Model 9090, Varian, Sunnyvale, CA, USA) et un détecteur UV standard à 210 nm. Deux colonnes de garde (Supelco Progel TSK PWH 7,5 mm × 7,5 cm et TSK GMPW 7,5 mm X 30 cm, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), suivie de deux colonnes analytiques (UltraHydrogel 2000 et 500, 7,5 mm × 30 cm, Waters Corporation, Mississauga, ON, Canada) ont été utilisées pour la détermination du poids moléculaire. La chromatographie a été réalisée sur des échantillons d'EPS 0,5%, au débit de 0,5 mL/min, avec un éluant aqueux (tampon phosphate 0,02 M, pH 7,0 contenant 0,10 M NaCl). La courbe standard a été établie à l'aide d'un ensemble de marqueurs de poids moléculaire de dextran de 5 à 750 kDa (Polymer Standard Service Inc., Silver Spring, MD, USA), ainsi que du bleu dextran de 2000 kDa (Sigma, St-Louis, MO, USA).

4. Stimulation des cellules spléniques

4.1 Préparation des splénocytes

Les cellules spléniques pour les stimulations ont été préparées à partir de souris femelles C57BL/6, BALB/c ou *nude* (Charles River Canada, St-Constant, Québec, Canada), âgées de 2 à 4 mois. Les rates ont d'abord été prélevées stérilement, puis triturées à l'aide de pinces. Les cellules ont ensuite été lavées avec du milieu RPMI 1640 complet (Appendice A) supplémenté avec 10% de SBF, comptées à l'aide d'un hématimètre, puis resuspendues (5×10^6 cellules/mL) dans du RPMI 1640 complet. La suspension cellulaire a ensuite été placée dans des plateaux 24-puits. Les splénocytes ont été stimulés, soit avec les deux souches bactériennes (1×10^6 , 1×10^7 et 1×10^8 bactéries/mL), soit avec les EPS entiers ou fractionnés (2500, 5000 et 10 000 ng/mL). Les contrôles positifs étaient le LPS (100 ng/mL, Sigma, St-Louis, MO, USA) pour les incubations de 6 h, ou la ConA (5 µg/mL, Sigma, St-Louis, MO, USA) pour les incubations de 24 h. Les contrôles négatifs étaient des splénocytes non stimulés. Dans le cas des stimulations avec les bactéries, des contrôles supplémentaires ont été ajoutés, il s'agissait du MRS et des deux surnageants de culture des bactéries. Les plateaux ont ensuite été incubés à 37°C, 5% CO₂, et humidité saturée pour 6 h (pour la détection d'IL-12 et de TNF-α) ou 24 heures (pour la détection d'IL-4 et d'IFN-γ). Pour la cinétique de production de l'IFN-γ, les temps d'incubation étaient de 6, 18, 24, 48 et 72 h. Après ce temps, les cellules ont été récoltées par centrifugation à $520 \times g$, 7 min. Les cellules ont été conservées à -80°C pour l'extraction d'ARN, et les surnageants à -20°C pour les bio-essais.

5. Biologie moléculaire

5.1 Isolation de l'ARN

Les échantillons de splénocytes ont été lysés à l'aide de Trizol LS (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), puis transférés dans des petits tubes à centrifuger. Le volume a ensuite été ajusté à 1,0 ml avec de l'eau DEPC (eau traitée dans le but de la débarrasser des ARNases). Les échantillons ont été incubés durant 5 min à la température ambiante.

Dans chaque tube, 200 μL de chloroforme ont été ajoutés. Les tubes bien bouchés ont été secoués vigoureusement pendant 15 s, puis incubés 10 min à 15-30°C. Les échantillons furent ensuite centrifugés à $12\,000 \times g$ pendant 15 min, à 4 °C. L'ARN se situait alors dans la phase aqueuse incolore supérieure.

Pour chaque tube, 400 μL de la phase aqueuse ont été transférés dans un tube stérile, après quoi l'ARN a été précipité à l'aide de 200 μL d'alcool isopropylique et de 20 μL de résine RNA-Tack (Biotecx laboratories, inc., Houston, TX, USA). Les tubes ont été vortexés 30 s, puis centrifugés brièvement à l'aide d'une microcentrifugeuse de table (Model 59A, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA, 3000 rpm). Le culot a ensuite subi deux lavages à l'éthanol 75%. Toute trace d'éthanol a été enlevée à l'aide d'un embout de pipette, puis le culot a été asséché quelques minutes dans un environnement stérile. Chaque culot a été resuspendu dans 25 μL d'eau DEPC, vortexé 30 s, puis centrifugé pendant 1 min. Chaque échantillon d'ARN purifié a ensuite été transféré dans un nouveau tube stérile.

La densité optique de chaque échantillon (1/200) a été mesurée à 260 nm (GeneQuant, RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech, Oakville, ON, Canada). Sachant qu'à cette longueur d'onde une absorbance de 1,000 correspond à une concentration d'ARN de 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, la concentration de chacun des échantillons a été ajustée à 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ avec de l'eau stérile DEPC.

5.2 Réaction de transcriptase inverse (RT)

Cette étape permettait de fabriquer un ADNc à partir de l'ARN isolé précédemment. Pour chacun des échantillons, 10 μL d'ARN ont été placés dans un tube stérile, puis le tout a été chauffé dans un bain-marie à 70°C pendant 5 min. Les tubes ont été refroidis sur glace. Ensuite, chaque tube a reçu les produits suivants : 1 μL d'Oligo dT 40 pmol (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Oakville, ON, Canada), 2 μL de tampon RT 10X (500 mM Tris pH 8,0, 625 mM KCl, 30 mM MgCl_2 , 100 mM DTT) (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Oakville, ON, Canada), 3 μL d'eau stérile DEPC, 1 μL de RNA

guard 28,9 U/ μ L (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Oakville, ON, Canada), 2 μ L de dNTP 10mM (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Oakville, ON, Canada) et 1 μ L de MulV 15,6 U/ μ L (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA). Les tubes ont été incubés durant 1h30 à 37°C, puis pendant un autre 5 minute à 94°C. Les tubes ont enfin été refroidis sur glace, puis conservés à 4°C.

5.3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Le volume optimal d'ADNc (déterminé lors des mises au point) a été placé dans un tube stérile. En travaillant sur glace, chaque tube a reçu les produits suivants : 5 μ L de tampon PCR 10X (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 9,0) (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Oakville, ON, Canada), 1 μ L de chacune des deux amorces (sens et antisens, 20 pmol/ μ L), 1 μ L de dNTP 10mM et 16 μ L du mélange d'enzyme. Ce mélange consistait en 15,75 μ L d'eau millipore stérile et 0,25 μ L de Taq polymérase 5 U/ μ L (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Oakville, ON, Canada). Le volume de chaque tube a été ajusté à 50 μ L en ajoutant de l'eau millipore stérile au besoin. Les conditions de PCR étaient (95°C, 30 s ; 60°C, 1 min ; 72°C, 1 min) x 35 cycles. Les séquences des amorces étaient les suivantes :

TNF : 5' CAG CCT CTT CTC ATT CCT GC 3' sens

5' GAC AAG GTA CAA CCC ATC GG 3' antisens (Daher *et al.*, 1998)

IFN- γ : 5' CAA GTG GCA TAG ATG TGG AA 3' sens

5' CTG GAC CTG TGG GTT GTT 3' antisens (Colle *et al.*, 1997)

IL-4 : 5' GAG CCA TAT CCA CGG ATG CGA CAA 3' sens

5' CAT GGT GGC TCA AGT ACT ACG AGT A 3' antisens (Colle *et al.*, 1997)

IL-12 : 5' CTG CCA CAA AGG AGG CGA GAC CTC 3' sens

5' CAT ATT TAT TCT GCT GCC GTG CTT C 3' antisens (Colle *et al.*, 1997)

GAPDH : 5' CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T 3' sens

5' CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC 3' antisens (Daher *et al.*, 1998)

Chaque échantillon a été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 2%, à 100 Volts pendant 1h15. Le gel a ensuite été visualisé et analysé à l'aide du détecteur UV Gel Doc 1000 et du Molecular Analyst Software, version 1.3 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

6. Mesure de la prolifération cellulaire

6.1 Coloration au bleu de thiazolyl (MTT)

Cette méthode visait à évaluer la croissance cellulaire des splénocytes lors des stimulations avec les fractions d'EPS. Dans un plateau 96-puits, 50 μL de suspension de splénocytes à 5×10^6 cellules/mL ont été placés dans chaque puits. Les splénocytes ont ensuite été stimulés avec la fraction et la concentration désirée, puis incubés à divers temps (24, 48, 72 h). Après l'incubation, 100 μL de MTT 0,1 mg/mL (Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON, Canada) ont été ajoutés à chaque puits. Les plateaux furent incubés à 37°C, après quoi les surnageants ont été aspirés doucement. Enfin, 100 μL de DMF-SDS ont été ajoutés à chaque puits et les plateaux furent incubés à 37 °C pendant 5 h. Les absorbances ont été lues à 570 nm à l'aide d'un lecteur de plaques (Easy Reader EAR 400 AT, SLT-LabInstruments, Grödig, Autriche).

6.2 Cytofluorométrie

Les splénocytes (5×10^6 cellules/mL) ont été placés dans des plateaux 24-puits, puis stimulés avec les fractions d'EPS aux concentrations désirées et incubés durant 24, 48 ou 72 h. Les cellules ont été récoltées, puis incubées en présence d'un anticorps conjugué à la fluorescéine (Fluorescein-conjugated goat affinity purified F(ab')₂ fragment to mouse IgG, lot # 00974, ICN Pharmaceuticals, Inc., Aurora, OH, USA) dilué 1/150. Chaque échantillon de cellules a ensuite été lavé avec un milieu FACS (Appendice A), puis suspendu dans 500 μL de FACS contenant 1% de paraformaldéhyde (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA), avant d'être analysé par le cytofluoromètre (EPICS XL-MCL, Beckman Coulter, Hialeah, FL, USA). Les splénocytes en division ont pu être déterminés sur la base de leur volume cellulaire doublé, et la proportion de cellules positives à la fluorescéine (lymphocytes B) parmi les splénocytes en division a été déduite.

7. Mesure de la sécrétion de cytokines

7.1 TNF- α

Cette technique est adaptée de Tremblay *et al.* (1995). Chaque puits d'un plateau 96-puits, excepté ceux dans la première colonne, a reçu 75 μ L d'une suspension à $3,3 \times 10^5$ cellules/mL de cellules L929 (ATCC CCL1). Les plateaux ont été incubés 24 h à 37 °C, avec 5% CO₂ et humidité saturée. Ensuite, 25 μ L d'une solution d'actinomycine 0.6 ng/mL (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) ont été ajoutés sauf dans les deux premières colonnes. En évitant les trois premières colonnes, 100 μ L des surnageants à tester ont été ajoutés, en triplicata, dans la rangée du haut. Pour chaque échantillon, des dilutions en série 1/2 ont été réalisées à partir de la rangée du haut jusqu'à celle du bas. Les plateaux ont encore été incubés à 37 °C, durant 16 à 20 h. Le surnageant a été jeté. Les cellules ont été fixées à la formaldéhyde 5% (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) pendant 5 min, colorées au violet de cristal 1% (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) pendant 5 min, puis solubilisées avec de l'acide acétique 33% (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA). Les absorbances ont finalement été lues à 540 nm avec un lecteur de plaques (Microplate Autoreader EL309, Bio-Tek instruments, Winooski, VT, USA). Les résultats ont été calculés en fonction du pourcentage de lyse cellulaire selon la formule suivante : $1 - (\text{moyenne de l'échantillon} / \text{moyenne de l'actinomycine}) \times 100 \%$. Une unité arbitraire correspondait au facteur de dilution provoquant 50% de lyse cellulaire.

7.2 IFN- γ

Cette méthode est adaptée de Migliorini et al. (1991). Dans des plateaux 96-puits, 100 μ L de suspension 2×10^5 cellules/mL de cellules RAW 264,7 (ATCC T1B71) ont été placés dans chaque puits. Les plateaux ont été incubés à 37°C pendant 18 à 24 h, puis le surnageant a été enlevé. Dans chaque puits, 50 μ L de LPS 20 ng/mL ont été ajoutés. Les surnageants (50 μ L) ont aussi été ajoutés en triplicata. Les plateaux furent encore incubés à 37°C durant 24 h. Ensuite, 50 μ L des surnageants ont été prélevés, puis placés dans un nouveau plateau 96-puits, en laissant libre trois colonnes pour faire la courbe

d'échantillonnage. Cette courbe consistait en dilutions en série de NaNO_2 de 400 μM à 3,125 μM . Les échantillons ont été colorés en ajoutant 100 μL de réactif de Griess à chaque puits. Après une incubation de 10-15 min à température ambiante, les plaques ont été lues à 540 nm. Les résultats furent exprimés en fonction de la courbe de NaNO_2 . La validation de ce test a été réalisée en ajoutant un anticorps monoclonal neutralisant de rat anti-IFN- γ de souris (10 mg/mL, Pharmingen, Mississauga, ON, USA) à des échantillons qui s'étaient révélés fortement réactifs (voir appendice F).

7.3 IL-6

Cette technique est adaptée de Tremblay *et al.* (1995). Le bio-essai de l'IL-6 a été réalisé à l'aide de cellules B9. Du milieu H-SFM a été réparti (50 μL) dans tous les puits d'un plateau 96-puits. Les surnageants à tester ont été placés (50 μL) dans la deuxième colonne, la première servant de blanc. Les échantillons ont ensuite été dilués en série 1/2 dans les colonnes suivantes. Une suspension de cellules B9 (1×10^5 cellules/mL) a été répartie dans les puits, à raison de 50 μL par puits. Les plateaux ont été incubés à 37°C, durant quatre jours, puis le MTT (0,5 mg/mL) a été ajouté (100 μL /puits). Les plateaux ont été incubés de nouveau durant toute la nuit, puis centrifugés à 720xg durant 5 min. Le surnageant a par la suite été aspiré doucement, puis le DMF-SDS a été ajouté aux puits (100 μL /puits). Les plateaux ont été incubés de nouveau durant 5 h, puis la densité optique à 570 nm a été lue. Pour chaque point, la moyenne de densité optique a été calculée. Les résultats ont été exprimés en pourcentage, considérant la plus haute moyenne de densité optique comme "100%". Une unité arbitraire correspond au facteur de dilution équivalant à 50% de la croissance maximale.

7.4 IL-12

Un ELISA (Quantikine M, Mouse IL-12 p40 Immunoassay, R and D Systems, Minneapolis, MN, USA) a été utilisé pour vérifier la production d'IL-12 p40 dans les surnageants de splénocytes stimulés avec les EPS, selon les directives du fabricant.

8. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées sur les données obtenues, à l'aide de la procédure ANOVA de SPSS (SPSS inc., Chicago, IL, USA), pour l'analyse de variance. Les comparaisons de moyennes ont été effectuées par le test LSD ("least significant difference") lorsqu'il y avait plus de deux groupes, ou par un test de t (Student t test) lorsqu'il y avait deux groupes. Lorsque les variances étaient inégales, l'équivalent non-paramétrique de ces tests a été utilisé. La comparaison des sécrétions d'IL-6 induites par les deux souches bactériennes ont été effectuées à l'aide d'un test de t de Student (comparaison par paires) dans Microsoft Excel 97 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Les résultats des analyses statistiques sont présentés à l'appendice G.

3. Résultats

1. Comparaison des effets immunomodulateurs des deux souches de bactéries

Plusieurs bactéries lactiques sont réputées probiotiques (voir revue de littérature). Le but de la présente étude était d'étudier les propriétés immunostimulantes de deux souches de bactéries lactiques. Les propriétés probiotiques peuvent être dues aux bactéries entières et/ou à des métabolites bactériens (EPS dans le cas présent). Plus spécifiquement, les objectifs de ce projet sont : de comparer les effets immunostimulants de deux souches jumelles de lactobacilles, l'une mucoïde (*L. rhamnosus* ATCC 9595) et l'autre non-mucoïde (*L. rhamnosus* RW-9595M); de produire des EPS par la souche mucoïde afin de les purifier et de les fractionner; et d'évaluer les effets immunostimulants des EPS produits par la souche mucoïde. Pour ce faire, des splénocytes de souris C57BL/6 ont été stimulés avec différentes concentrations, soit des bactéries, soit des EPS, et la production des cytokines dans le milieu (ou l'expression des gènes de cytokines dans les cellules spléniques) a été mesurée. Les cellules immunocompétentes des C57BL/6 produisent de l'IFN- γ , sans IL-4 (Th1 par défaut) (Heinzel *et al.*, 1989 ; Kelso *et al.*, 1991). Deux autres lignées murines ont été utilisées simultanément avec les C57BL/6 lors d'une seule expérience de stimulation de splénocytes avec les EPS totaux et la fraction 1 (F1) de ces mêmes EPS. Il s'agit des BALB/c qui expriment un phénotype Th2 par défaut (production d'IL-4, sans IFN- γ) (Heinzel *et al.*, 1989 ; Kelso *et al.*, 1991). Enfin, des souris nude ont aussi été utilisées; celles-ci ne possèdent pas de thymus fonctionnel, et sont donc dépourvus de lymphocytes T "conventionnels" (McDonald *et al.*, 1987) (voir discussion à ce sujet).

1.1 TNF

1.1.1 expression du gène du TNF

Le rapport densitométrique de l'intensité du gène du TNF comparé au gène de référence, la GAPDH, est plus élevé pour *Lb. rhamnosus* ATCC 9595 que pour RW-9595M (tableau I). Les deux souches de bactéries ont stimulé l'expression du gène du TNF, comparativement aux niveau basal des splénocytes non stimulés (0,68). Les splénocytes stimulés avec *Lb. rhamnosus* ATCC 9595 démontrent un niveau d'expression qui semble généralement plus élevé (0,73 à 1,27) que ceux stimulés avec le LPS (0,96), tandis que les

splénocytes stimulés avec *Lb. rhamnosus* RW-9595M montrent un niveau d'expression du gène du TNF inférieur (0,77 à 0,9) au niveau obtenu avec le LPS. Cependant, la différence n'est pas significative ($p > 0,05$).

1.1.2 sécrétion du TNF

La sécrétion de TNF des splénocytes stimulés a été mesurée à l'aide d'un bio-essai, dont les résultats sont illustrés à la figure 4. La sécrétion de TNF induite par la souche non-mucoïde est supérieure ou égale à celle obtenue avec le LPS. La souche mucoïde induit peu ou pas de sécrétion de TNF. La différence de sécrétion entre les deux souches de bactéries est significative ($p \leq 0,05$). Par contre, la concentration des bactéries n'a aucun effet sur la quantité de TNF sécrété ($p > 0,05$) (Appendice G).

1.2 IL-6

La figure 5 illustre la sécrétion d'IL-6 par des splénocytes de souris C57B/6 stimulés avec *Lb. rhamnosus* ATCC 9595 et RW-9595M. Les sécrétions d'IL-6 induites par les deux souches bactériennes sont comparables, car aucune différence significative n'est observée ($p > 0,05$). Les macrophages produisent habituellement un niveau basal d'IL-6 qui n'est pas nul, comme en témoigne le contrôle négatif (cellules non stimulées). Le témoin positif aurait dû être le LPS au lieu de la ConA. La raison de ce fait est que lors du design expérimental, deux temps d'incubation ont été déterminés pour les dosages de cytokines : 6 h pour TNF et IL-12 et 24 h pour IFN- γ et IL-4. La décision de doser l'IL-6 est venue après que les stimulations aient été effectuées, avec les contrôles mentionnés auparavant. La quantité d'IL-6 mesurée après 6 h d'incubation étant insuffisante, il a fallu se contenter des échantillons incubés 24 h. Cependant, ceci n'invalide pas les résultats obtenus pour les groupes expérimentaux (1×10^6 , 1×10^7 et 1×10^8 UFC/mL), puisqu'ils se situent tous au-dessus du niveau basal.

1.3 IFN- γ

L'expression du gène de l'IFN- γ est stimulée de façon comparable ($p > 0,05$) par les deux souches de bactéries (tableau I). En ce qui concerne la sécrétion d'IFN- γ , les deux

souches exercent aussi un effet semblable, car la différence n'est pas significative ($p>0,05$). De même, la concentration bactérienne est sans effet sur la sécrétion de l'IFN- γ ($p>0,05$) (figure 6).

Tableau I. Exemple d'une expérience illustrant le rapport des gènes du TNF et de l'IFN- γ par rapport au gène de GAPDH chez des splénocytes de souris C57BL/6 stimulés avec *Lb. rhamnosus* ATCC 9595 et RW-9595M

Traitement	Concentration (UFC/mL)	TNF/GAPDH ^a	IFN- γ /GAPDH ^a
Contrôle cellulaire	-	0,68	0
ATCC 9595	1x10 ⁶	0,79	1,14
	1x10 ⁷	1,27	1,29
	1x10 ⁸	1,16	0,93
RW-9595M	1x10 ⁶	0,84	1,01
	1x10 ⁷	0,77	0,99
	1x10 ⁸	0,9	0,94
LPS	-	0,96	-
ConA	-	-	0,96

^a Les valeurs obtenues avec les deux souches ont été comparées à l'aide d'un test de t. Les rapports TNF/GAPDH entre les deux souches ne sont pas significativement différents (p=0,275). Il en va de même pour les rapports IFN- γ /GAPDH (p=0,259)

Figure 4. Sécrétion de TNF par des splénocytes de souris C57BL/6 stimulés avec *Lb. rhamnosus* ATCC 9595 et RW 9595M

Cet histogramme représente la sécrétion de TNF retrouvée dans les surnageants de splénocytes stimulés durant 6 heures avec chacune des deux souches de *L. rhamnosus*. Les concentrations de bactéries utilisées pour les stimulations sont 1×10^6 , 1×10^7 et 1×10^8 UFC/mL. Chaque valeur représente la moyenne de cinq expériences indépendantes, accompagnée de l'écart-type correspondant. La différence de sécrétion de TNF induite par ces souches bactériennes est significativement différente ($p=0,00$). Par contre, il n'y a pas d'effet de la concentration sur la sécrétion de TNF ($p=0,058$).

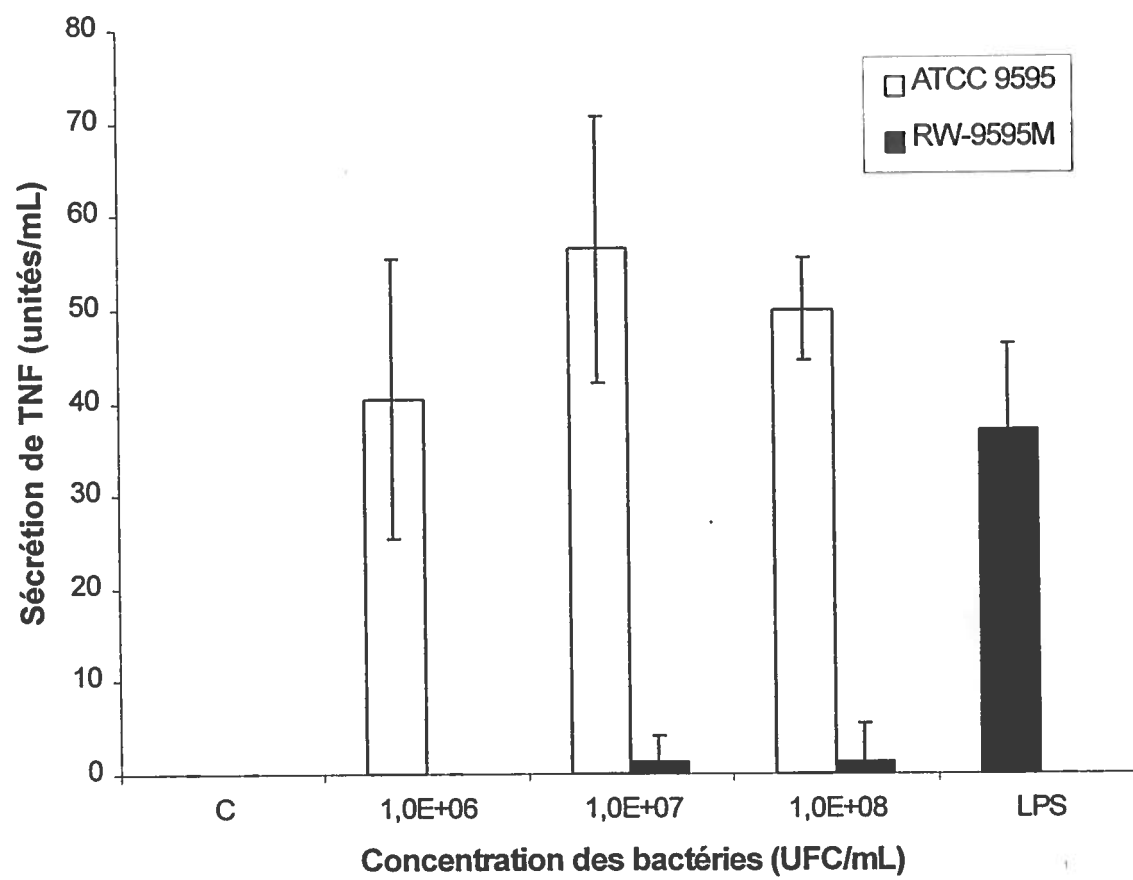


Figure 5. Sécrétion d'IL-6 par des splénocytes de souris C57BL/6 stimulés avec *Lb. rhamnosus* ATCC 9595 et RW-9595M

Les splénocytes ont été stimulés avec chaque souche bactérienne. Les concentrations employées étaient 1×10^6 , 1×10^7 et 1×10^8 UFC/mL. La quantité d'IL-6 sécrétée a été mesurée à l'aide d'un bio-essai. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires. Une unité représente le facteur de dilution correspondant à 50% de la croissance cellulaire maximale. Il n'y a pas de différence significative entre les souches bactériennes ($p=0,788$).

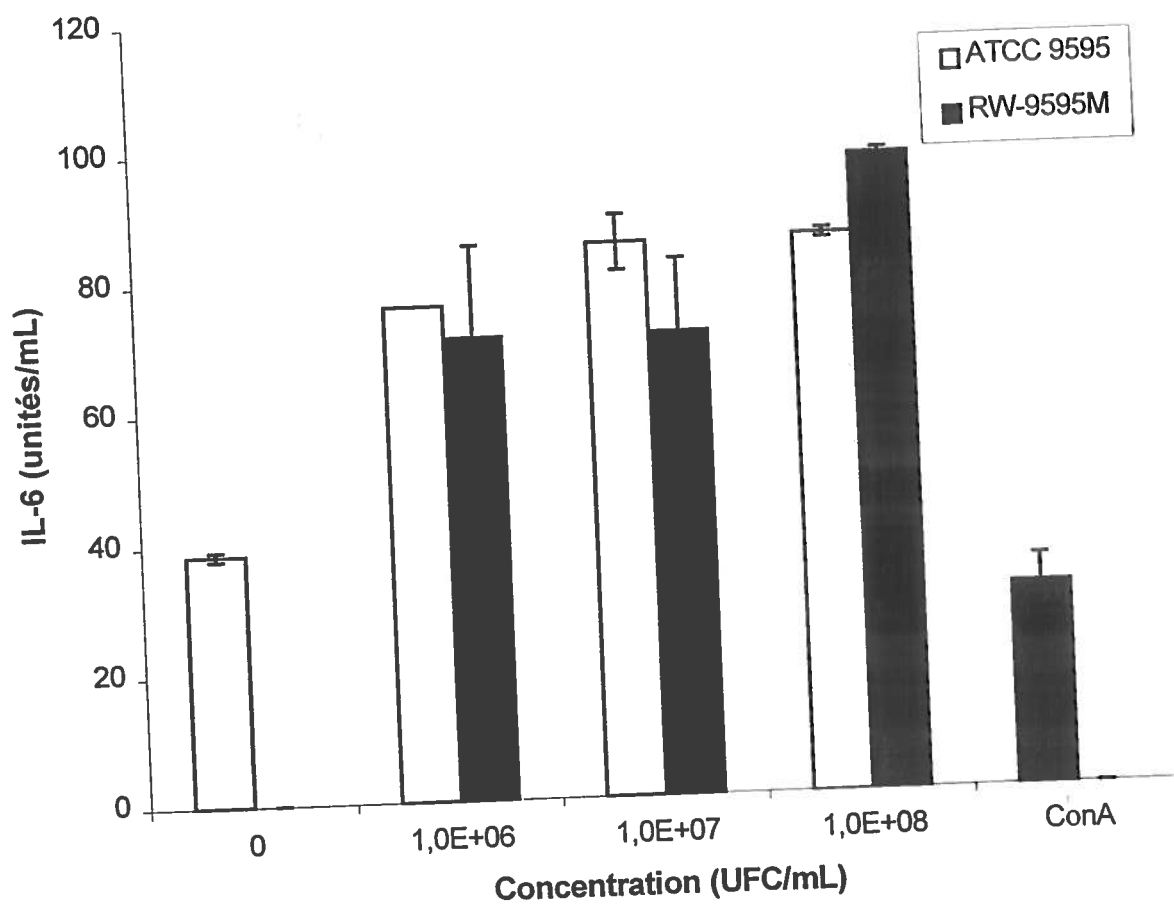
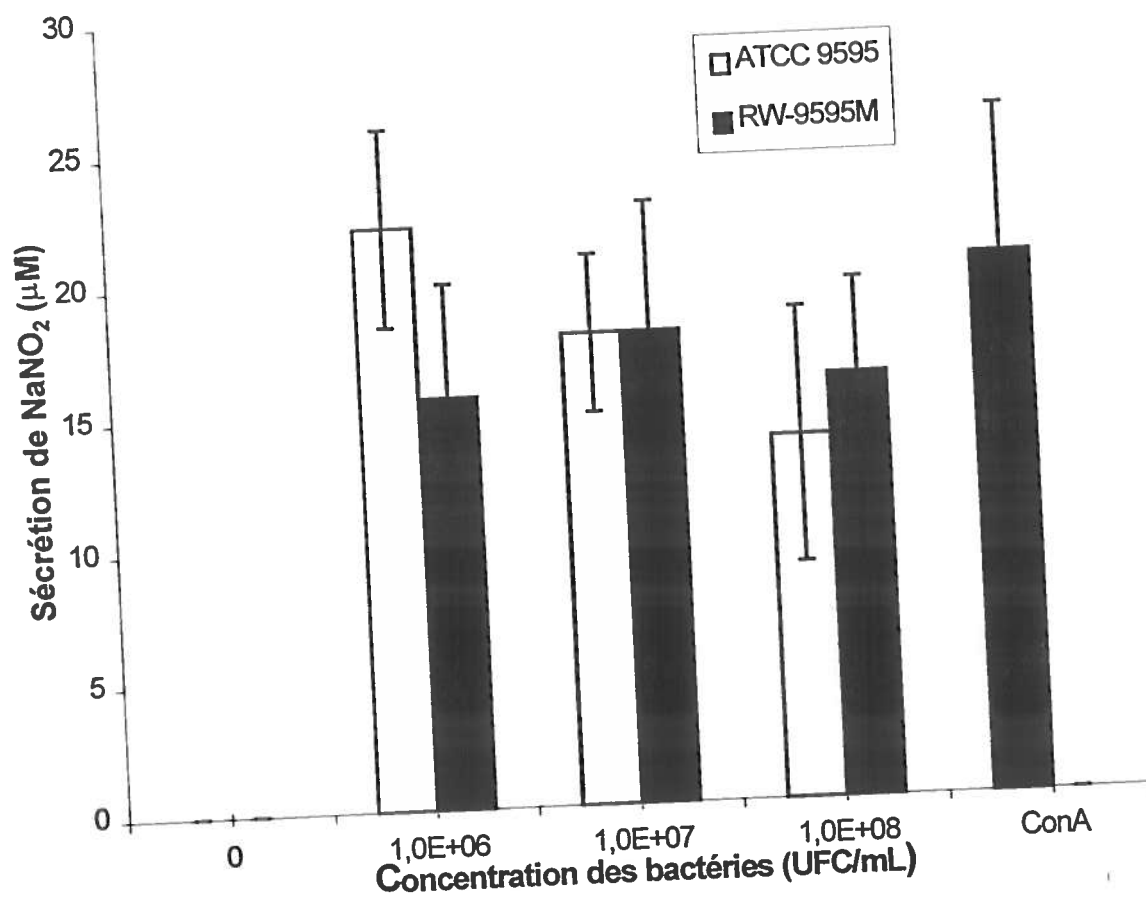


Figure 6. Sécrétion d'IFN- γ par des splénocytes de souris C57BL/6 stimulés avec *Lb. rhamnosus* ATCC 9595 et RW 9595M

Ce graphique démontre la sécrétion d'IFN- γ retrouvée dans les surnageants de splénocytes stimulés durant 24 heures avec chacune des deux souches de *Lb. rhamnosus*. Les concentrations de bactéries utilisées pour les stimulations sont 1×10^6 , 1×10^7 et 1×10^8 bactéries/mL. Chaque valeur représente la moyenne de cinq expériences indépendantes, accompagnée de l'écart-type correspondant. La sécrétion d'IFN- γ induite par les souches bactériennes n'est pas significativement différente ($p=0,201$), de même que la sécrétion induite par les différentes concentrations de bactéries ($p=0,251$). La concentration de NaNO_2 est proportionnelle à celle de l'IFN- γ , tel que confirmé par la validation à l'aide d'un anticorps neutralisant anti-IFN- γ (Appendice F).



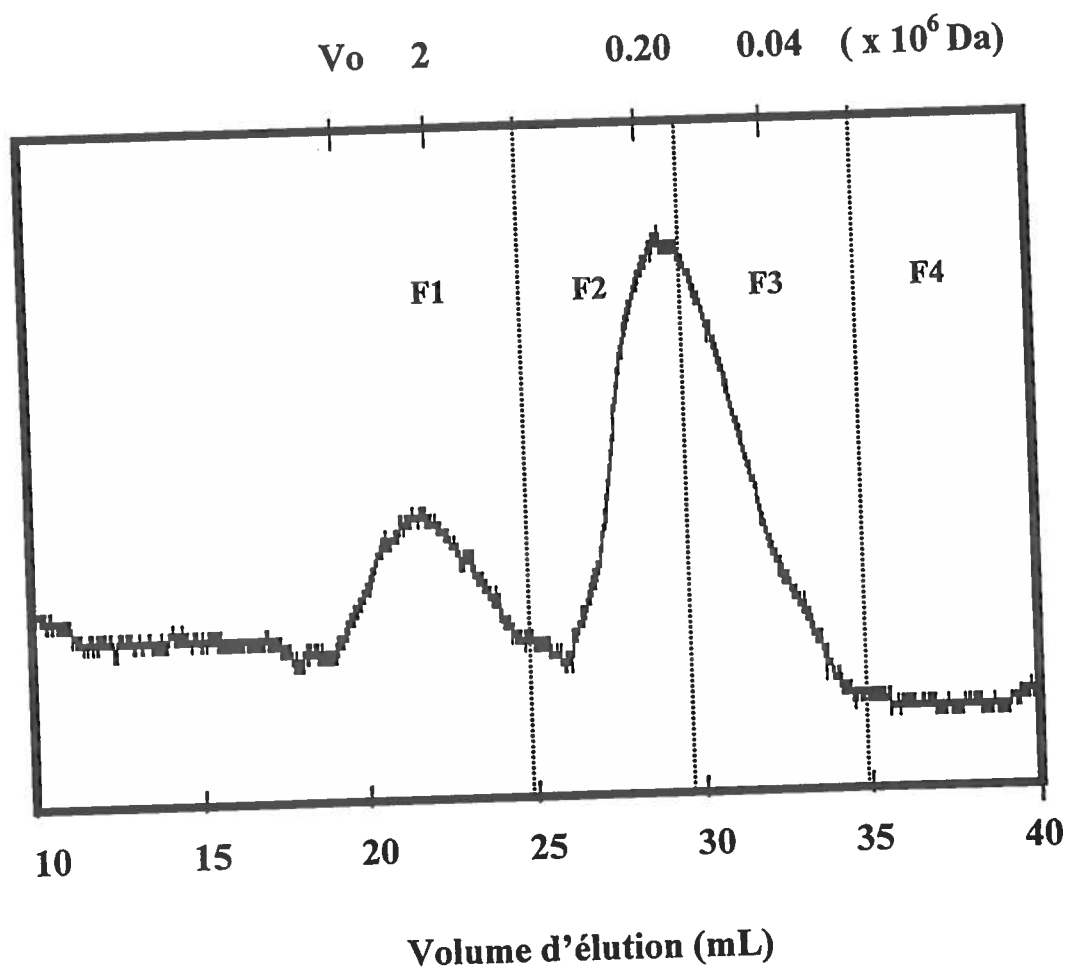
2. Purification et fractionnement des EPS

Le contenu en protéines mesuré après purification des EPS au TCA 10% était à la limite de détection de la méthode ; sa valeur n'est probablement pas très significative. Le contenu en protéines après le passage sur la dernière membrane de filtration était inférieur aux limites de détection de la méthode (appendice E).

Lb. rhamnosus RW-9595M produit des EPS comprenant deux fractions différentes : l'une formant un pic à environ 2000 kDa et l'autre, à environ 180 kDa (figure 7). Les porosités des membranes utilisées lors de la filtration sont indiquées à l'aide de pointillés et déterminent quatre fractions principales qui devraient théoriquement être obtenues. La répartition réelle de ces quatre fractions après filtration est indiquée dans l'appendice D.

Figure 5. Profil HPLC des EPS produits par *Lb. rhamnosus* RW-9595M

Ce schéma indique deux pics principaux, à 2000 kDa et 180 kDa. Les lignes en pointillé indiquent les porosités des membranes utilisées lors de la filtration. F1, F2, F3 et F4 représentent les quatre fractions obtenues théoriquement après la filtration sur membrane.



3. Détermination de l'activité immunomodulatrice des EPS

3.1 Propriétés mitogéniques des EPS

Toutes les fractions, sauf F4, stimulent la prolifération des splénocytes (tableau II) de manière significative ($p \leq 0,05$). Cependant, la stimulation de la prolifération exercée par F1 est même très significative ($p \leq 0,01$) et son action se rapproche le plus de celle du LPS.

La cytofluorométrie a permis de confirmer que les cellules en division semblaient se composer en majorité de lymphocytes B. Après 24 à 48 h de stimulation avec F1, près de 70% des cellules en division étaient positives à l'anticorps (figure 8). L'effet de F1 est celui qui se rapproche le plus de l'effet du LPS. La fraction F2 stimule aussi la prolifération cellulaire des lymphocytes B, mais de façon un peu moins importante que F1.

Étant donné la faible quantité disponible de F2 et F4, et l'action plus faible de F3, les expériences ultérieures ont été réalisées seulement avec F1 et les EPS entiers (non fractionnés), en parallèle.

3.2 Cytokines pro-inflammatoires (TNF et IL-6)

Aucune sécrétion de TNF n'a pu être décelée chez les splénocytes de souris C57BL/6 stimulés avec F1 ou les EPS entiers. Cependant, les splénocytes des souris BALB/c et *nude*, de même que la lignée de macrophages murins RAW 264,7 ont répondu de façon variable (Tableau III). Par ailleurs, une sécrétion d'IL-6 a été observée chez des splénocytes de souris C57BL/6, BALB/c et *nude* (figure 9). C'est chez cette dernière souche de souris que l'effet est le plus spectaculaire, atteignant près de 14 fois l'effet obtenu avec la ConA. Les splénocytes de BALB/c atteignent environ 3 fois l'action de la ConA et les splénocytes de C57BL/6 demeurent en dessous de l'effet de la ConA.

Tableau II. Mesure de la prolifération de splénocytes de souris C57BL/6 stimulés durant 48 heures avec chacune des fractions des EPS produits par *Lb. rhamnosus* RW-9595M, tel que déterminé par la coloration au bleu de thiazolyl (MTT)

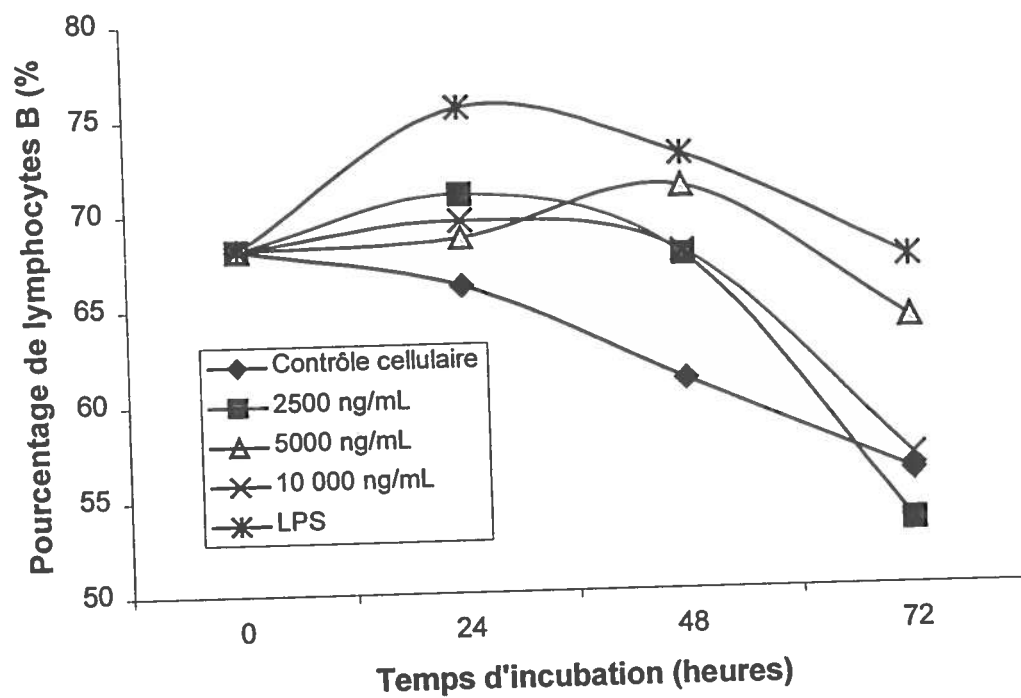
Fraction	Concentration (ng/mL)	Prolifération cellulaire moyenne (%) ^a	Écart-type	Valeur de p (test de t)
F1	2500	115 ^{**}	3,2	0,007
	5000	129.4 ^{**}	3,1	0,001
	10 000	123.9 [*]	4,4	0,04
F2	2500	114.9 [*]	5,5	0,02
	5000	120.8 [*]	10,3	0,04
	10 000	125.9 [*]	2,5	0,02
F3	2500	109.4 ^{**}	2,1	0,008
	5000	112.6 [*]	6,2	0,04
	10 000	114.3 [*]	3,1	0,05
F4	2500	106.3	8,9	0,25
	5000	96.2	1,1	0,06
LPS	100	134.6 ^{**}	8,4	0,004

^a Les résultats sont exprimés en considérant le contrôle négatif (non stimulé) comme «100%». Chaque point expérimental correspond à la moyenne de 2 (10 000 ng/mL) ou 3 (2500 et 5000 ng/mL) expériences indépendantes avec n=6-8. Les valeurs ont été comparées au contrôle négatif par un test de *t*. Les astérisques signifient le degré de signification : toute valeur suivie d'un ^{*} est significative à un niveau de 95% ($p \leq 0.05$) et toute valeur suivie de deux ^{**} est significative à un niveau de 99% ($p \leq 0.01$).

Figure 6. Pourcentage de lymphocytes B dans une population de splénocytes en division, lors d'une stimulation avec F1 et F2

Les splénocytes ont été stimulés avec a) F1 et b) F2. Les splénocytes en division étaient sélectionnés sur la base de leur volume cellulaire doublé par rapport aux splénocytes au repos. Dans cette zone, le pourcentage de cellules positives à l'anticorps anti-IgG, conjugué à la fluorescéine a été comptabilisé. Chaque point expérimental représente le comptage de 10 000 cellules (n=10 000) en cytofluorométrie.

a)



b)

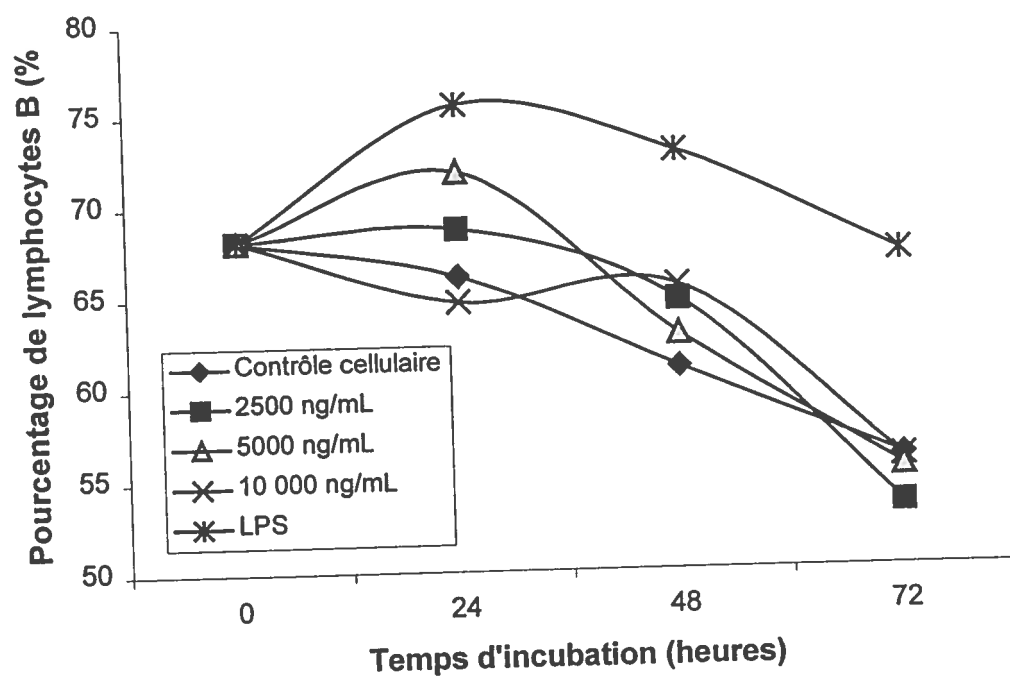


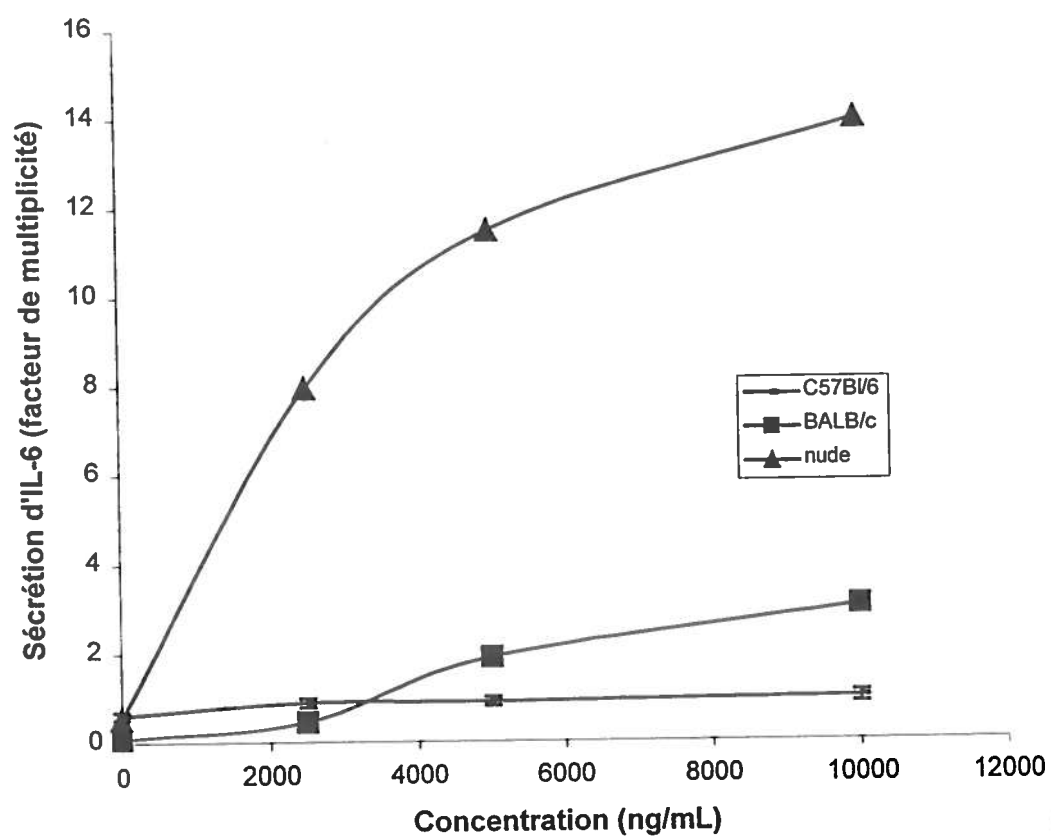
Tableau III. Comparaison de la sécrétion de TNF par des splénocytes de souris C57BL/6, BALB/c et *nude*, ainsi que par des macrophages murins RAW 264.7, stimulés avec F1 ou les EPS entiers.

Traitement	Concentration (ng/mL)	Sécrétion de TNF (unités/mL) ^a			
		C57BL/6	BALB/c	<i>nude</i>	RAW 264.7
Contrôle	0	0	0	0	0
F1	2500	0	0	0	605
	5000	0	19	0	1018
	10000	0	18,5	31,8	1835
EPS entiers	2500	0	0	0	838
	5000	0	0	0	1306
	10000	0	19	33,4	2228
LPS	100	18,1	23	24,1	2560

^a Les résultats représentent une expérience unique destinée à comparer simultanément les sécrétions de TNF par des cellules de quatre origines différentes. Une seule stimulation a été effectuée en quadruplicata; les surnageants ont ensuite été mis en commun pour le bio-essai du TNF.

Figure 7. Sécrétion d'IL-6 par des splénocytes de souris C57BL/6, BALB/c et *nude*, lors d'une stimulation de 24 heures avec F1

Pour les souris C57BL/6, les valeurs représentées sont la moyenne de 6 expériences indépendantes, avec l'écart-type correspondant. En ce qui concerne les souris BALB/c et *nude*, les valeurs représentent une seule expérience. Les valeurs sont exprimées en considérant le témoin positif ConA comme un facteur de multiplicité de "1", et dont la valeur est de 71,7, 111,9 et 115,1 unités arbitraires/mL respectivement pour les splénocytes de souris *nude*, BALB/c et C57BL/6.. Une unité représente le facteur de dilution correspondant à 50% de la croissance cellulaire maximale.



3.3 IL-12

Comme il n'y avait aucun bio-essai disponible pour mesurer l'IL-12, un ELISA a donc été réalisé sur les splénocytes des trois souches de souris C57BL/6, BALB/c et *nude*. Les splénocytes des deux premières souches de souris ont démontré une sécrétion d'IL-12 p40, tandis que chez ceux des souris *nude*, aucune trace de cette cytokine n'a été détectée (figure 10).

3.4 IFN- γ

La transcription du gène de l'IFN- γ est activée chez les splénocytes de C57BL/6 stimulés avec F1 et les EPS entiers (figure 11). Cette figure montre un résultat strictement qualitatif, et le rapport à la GAPDH n'a pas été déterminé dans ce cas. Il est intéressant de noter la variation d'intensité des bandes, selon les concentrations de polysaccharides employées. Ces concentrations ont été déterminées lors des tests préliminaires de prolifération : un grand éventail de concentrations ont été testées, et les données obtenues formaient une courbe en cloche. Les concentrations choisies (2500, 5000 et 10 000 ng/mL) se situaient en haut de cette courbe, le point 5000 ng/mL constituant le sommet. Cette tendance semble se refléter également dans l'intensité des bandes observées à la figure 11; c'est ce qui expliquerait que les points 10 000 ng/mL présentent des bandes d'intensité plus faible que les points 5000 ng/mL, où l'intensité est maximale. Dans le cas des EPS entiers, l'intensité des bandes est plus faible qu'avec F1, si bien que les points 2500 et 10 000 ng/mL semblent montrer une absence de bande, imputable au procédé d'impression.

F1 et les EPS entiers sont capables d'induire la sécrétion d'IFN- γ par les splénocytes de souris C57BL/6 (figures 12 et 13), ainsi que de souris BALB/c et *nude* (figure 13). Ces deux dernières souches de souris semblent répondre plus fortement que les C57BL/6.

Le tableau IV compare les sécrétions d'IL-12 p40 et d'IFN- γ par des splénocytes de souris C57BL/6. Au fur et à mesure que la concentration des EPS augmente, la sécrétion d'IL-12 p40 demeure relativement constante pendant que la sécrétion d'IFN- γ croît de manière dose dépendante. La production d'IL-12 semble indépendante de l'IFN- γ .

Une étude de la cinétique de production de l'IFN- γ a révélé que la sécrétion atteint un plateau après 48 heures d'incubation en présence de F1 (figure 14). Il est intéressant de souligner le fait qu'aucune sécrétion n'a été détectée au temps $t=6$ heures. Le temps d'incubation choisi pour les stimulations de splénocytes, $t=24$ heures, se situe dans la portion croissante de la courbe.

Figure 8. Sécrétion d'IL-12 p40 mesurée dans les surnageants de splénocytes de souris C57BL/6, BALB/c et *nude* stimulés 24 heures avec F1

Les valeurs représentent une seule expérience comparant simultanément les trois souches de souris. Pour cette cytokine seulement, un ELISA a été utilisé. Il est à noter que chez les splénocytes de *nude*, aucune sécrétion d'IL-12 p40 n'a pu être décelée. Les résultats sont exprimés en considérant le LPS comme un facteur de multiplicité de "1", qui représentait 76,6 pg/mL, 121 pg/mL et 0 pg/mL respectivement pour les souris C57BL/6, BALB/c et *nude*.

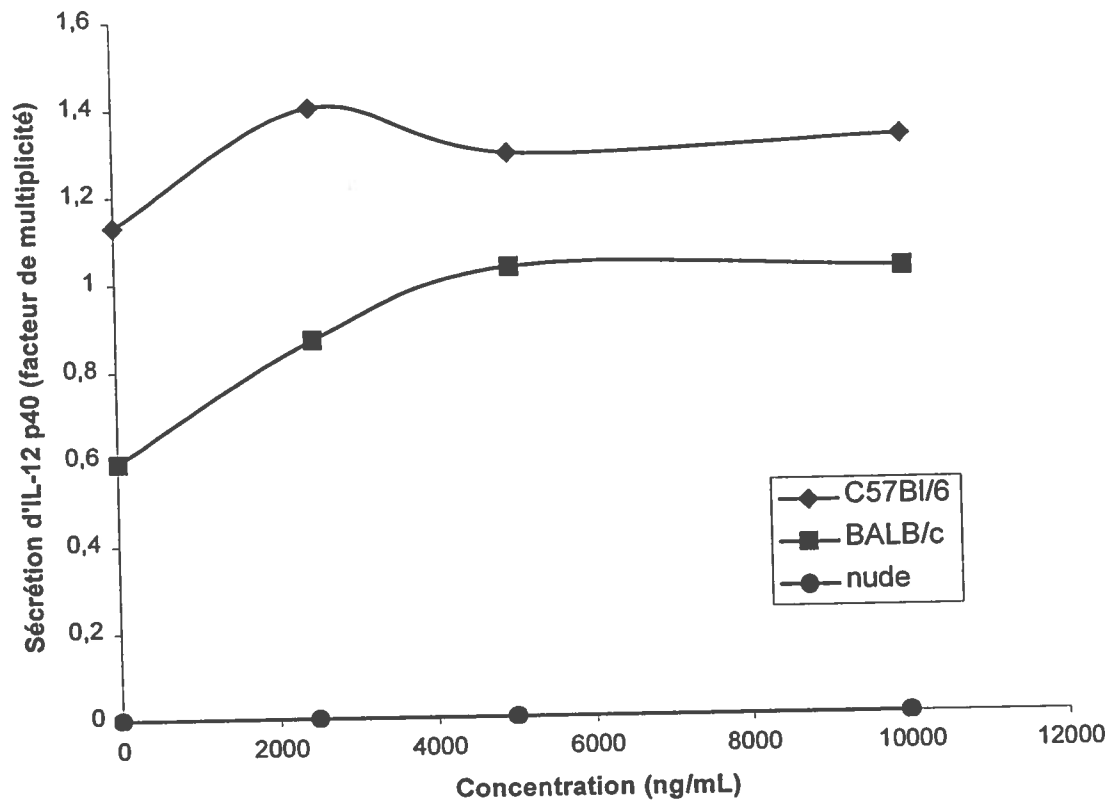


Figure 9. Expression qualitative du gène de l'IFN- γ chez des splénocytes de souris C57BL/6 stimulés avec F1 et les EPS entiers (non fractionnés)

Une portion du gène de l'IFN- γ a été amplifié par PCR, puis les produits ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 2% (photo du haut). Les puits 1, 2 et 3 représentent la stimulation avec F1 aux concentrations respectives de 2500 ng/mL, 5000 ng/mL et 10 000 ng/mL. Les puits 4, 5 et 6 correspondent aux mêmes concentrations (2500 ng/mL, 5000 ng/mL et 10 000 ng/mL) des EPS entiers. Le puits 7 réfère à des splénocytes non stimulés (contrôle cellulaire) et le puits 8, au témoin positif (ConA, 5 μ g/mL). La photo du bas représente l'expression du gène de la GAPDH (gène de référence). Les chiffres 1 à 8 réfèrent aux mêmes groupes expérimentaux que sur la photo du haut, mais en plus montre un témoin positif (puits 9) et un témoin négatif (puits 10) pour la réaction de PCR.

Taille (pb)

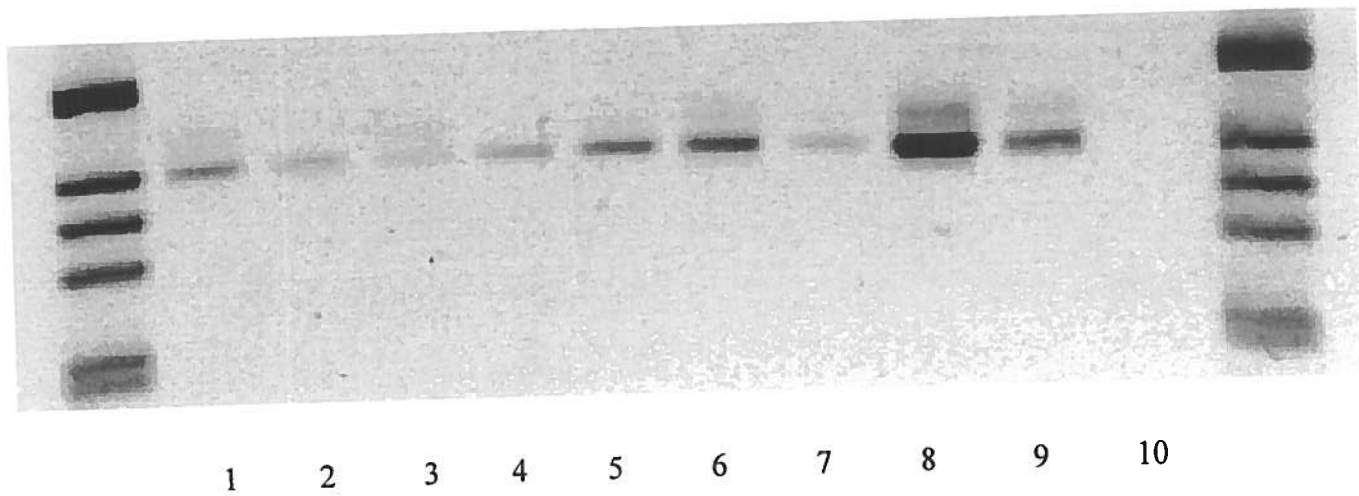
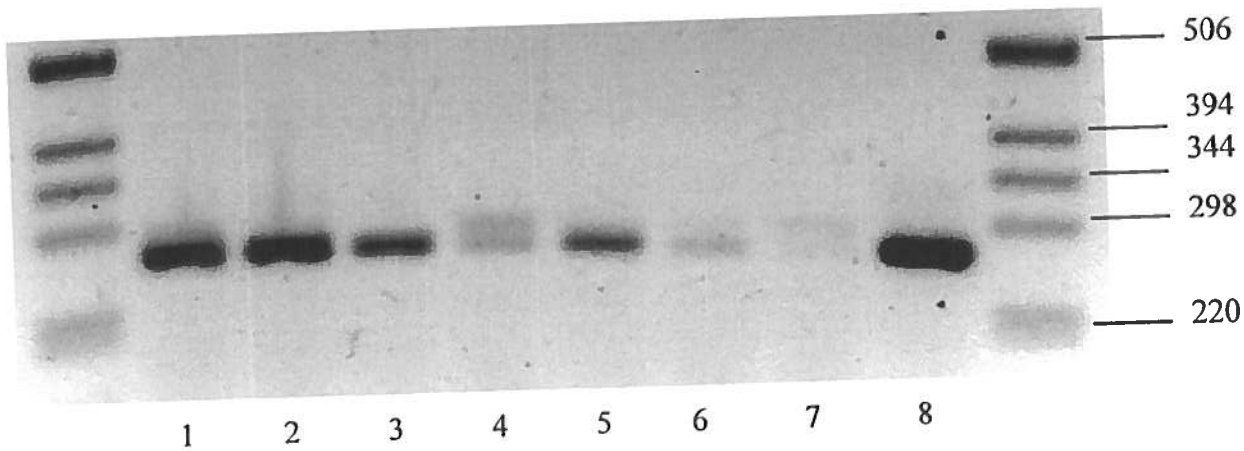


Figure 10. Sécrétion d'IFN- γ par des splénocytes de souris C57BL/6 stimulés durant 24 heures avec F1

Ce graphique illustre la sécrétion d'IFN- γ dans les surnageants de splénocytes de C57BL/6 stimulés avec F1 (2500, 5000 ou 10 000 ng/mL). Les valeurs représentent la moyenne de 6 expériences indépendantes avec l'écart-type correspondant. Les valeurs sont exprimées en considérant le contrôle positif (ConA) comme un facteur de multiplicité de "1", et dont la valeur variait de 11,7 μ M à 22,5 μ M. Il n'y a pas de différence significative entre les concentrations de F1 employées ($p=0,146$).

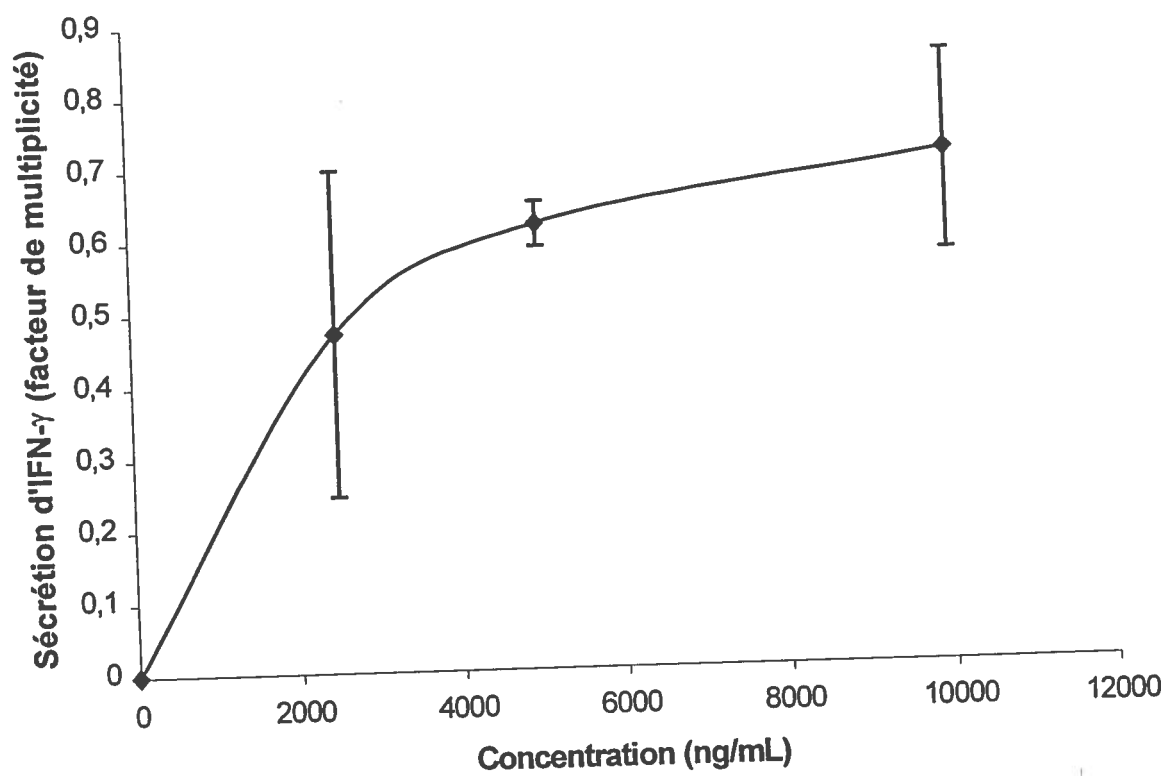


Figure 11. Sécrétion d'IFN- γ par des splénocytes de souris C57BL/6, BALB/c et *nude* stimulés durant 24 heures avec F1

Les valeurs représentent une seule expérience comparant simultanément les trois souches de souris. Les résultats sont exprimés en proportion du témoin positif ConA, considéré comme un facteur de multiplicité de "1" et qui correspondait à 55,4 μ M, 30,7 μ M et 36,7 μ M, respectivement pour les souris C57BL/6, BALB/c et *nude*.

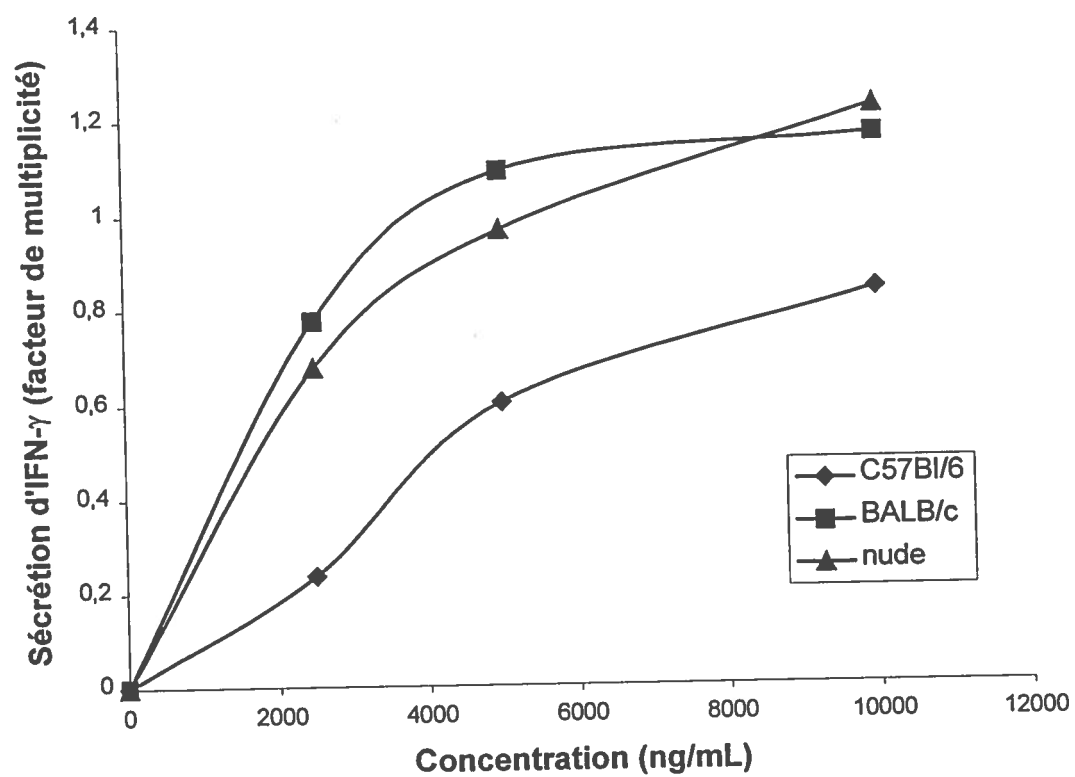


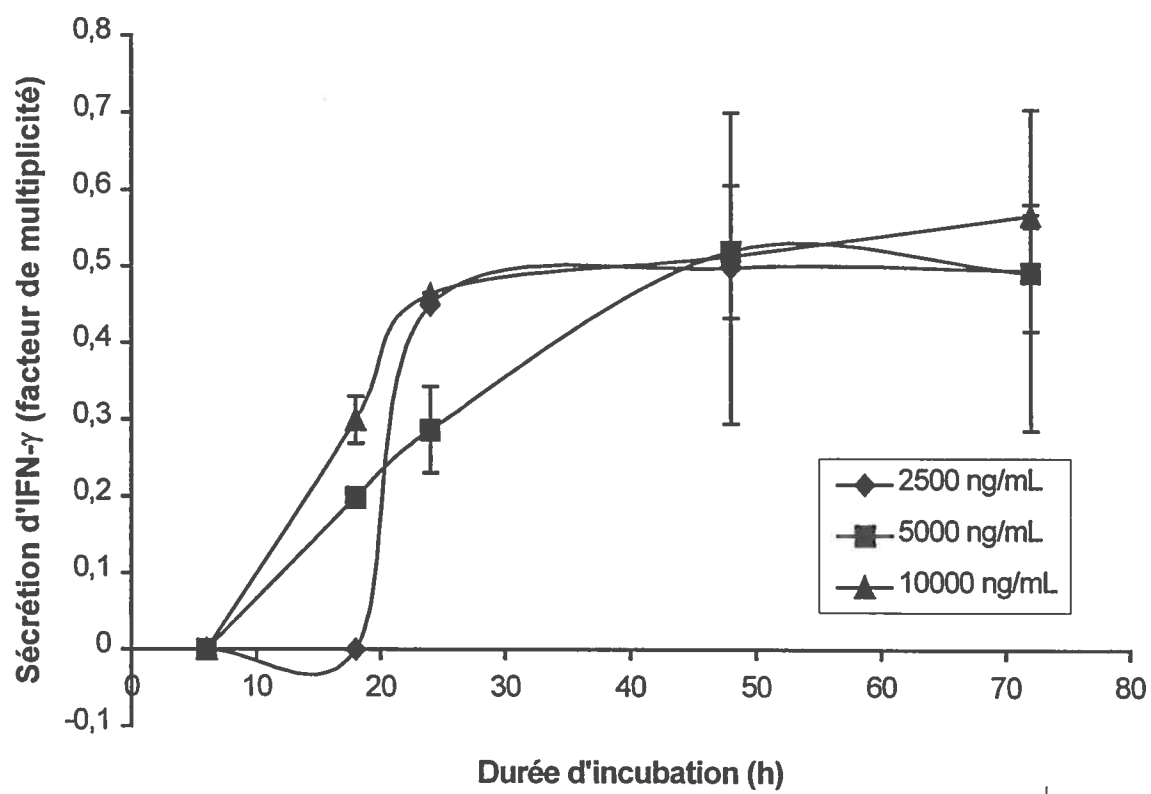
Tableau IV. Exemple d'une expérience comparant les sécrétions d'IL-12 p40 et d'IFN- γ par des splénocytes de C57BL/6 stimulés durant 24 heures avec F1 et les EPS entiers

Traitement	Concentration (ng/mL)	IL-12 p40 (pg/mL)*	IFN- γ (μ M)*
Contrôle cellulaire	-	86.6	0
F1	2500	107.2	4.8
	5000	98.6	9.8
	10 000	101.2	12.5
EPS entiers	2500	83.2	0.2
	5000	73.6	2.8
	10 000	80.8	13.1
LPS	100	76.6	-
ConA	5000	-	16.9

* Les mesures des sécrétions de l'IL-12 p40 et d'IFN- γ proviennent des mêmes échantillons, lors d'une expérience unique effectuée en quadruplicata. Les surnageants des cellules stimulées de la même façon ont été mis en commun avant les dosages de cytokines.

Figure 12. Cinétique de production de l'IFN- γ chez des splénocytes de C57BL/6 stimulés avec F1

Le graphique illustre la moyenne de 3 expériences indépendantes accompagnées de l'écart-type correspondant. Dans tous les cas, aucune sécrétion d'IFN- γ n'a été décelée après 6 heures d'incubation avec F1. Les résultats sont exprimés en proportion du contrôle positif (ConA) qui était considéré comme un facteur de multiplicité de "1" et qui variait de 13,6 μ M à 57,2 μ M.



4. Discussion

1. Comparaison des effets immunostimulateurs des deux souches bactériennes

L'industrie alimentaire utilise traditionnellement plusieurs polysaccharides microbiens comme agents épaississants, en remplacement des gommes d'origine végétale. Cependant, les microorganismes produisant ces substances ne possèdent pas toujours un statut "sécuritaire". Par exemple, l'un de ces microorganismes est *Xanthomonas campestris*, un **phytopathogène**, qui produit la gomme xanthane, très utilisée autant dans les industries alimentaires que non-alimentaires (van Kranenberg *et al.*, 1999). C'est pourquoi les bactéries lactiques, reconnues comme étant généralement non-pathogènes, possèdent un statut sécuritaire (GRAS : Generally Recognized As Safe). Pour cette raison, et parce que les bactéries lactiques possèdent l'avantage de pouvoir être utilisées *in situ* dans les aliments, plusieurs souches productrices de polysaccharides sont de plus en plus étudiées afin d'améliorer leurs caractéristiques, dans une perspective d'amélioration des propriétés rhéologiques des aliments (van Kranenberg *et al.*, 1999). De plus, les polysaccharides produits par les bactéries lactiques possèdent un pouvoir épaississant si puissant que la quantité nécessaire est moindre que ce qui serait requis en gomme végétale ou en polysaccharide microbien traditionnel (Ricciardi et Clementi, 2000). C'est ainsi que la recherche de souches de bactéries lactiques hautement productives en polysaccharides, c'est-à-dire mucoïdes, est devenue un sujet d'intérêt. Cependant, un phénomène de perte du caractère mucoïde, caractère souvent associé à un plasmide, a été observé à plusieurs reprises chez diverses souches de bactéries lactiques. Ce phénomène constitue un réel problème pour l'industrie laitière (Kleerebezem *et al.*, 1999). D'autre part, l'apparition spontanée du caractère mucoïde est plutôt inhabituelle et peut provenir d'une mutation. *Lb. rhamnosus* RW-9595M est une souche mucoïde qui a été isolée à partir de la souche *Lb. rhamnosus* ATCC 9595, ces deux souches possédant la même empreinte génétique (Dupont *et al.*, 2000). La seule différence entre ces souches est donc que la première possède le caractère mucoïde, tandis que la seconde ne le possède pas. *Lb. rhamnosus* RW-9595M, qui peut produire jusqu'à 1200 mg/L de polymère (considéré sans danger pour la santé des consommateurs) constitue donc une forme mutante de *Lb. rhamnosus* ATCC 9595. Cependant, la nature exacte de la mutation est inconnue jusqu'ici (Dr. Denis Roy, communication personnelle). En plus de

leurs qualités technologiques (amélioration des propriétés rhéologiques), des hypothèses ont été émises à l'effet que les bactéries lactiques posséderaient des propriétés probiotiques, dont la stimulation du système immunitaire de l'hôte. Dans le but de vérifier cette hypothèse, *Lb. rhamnosus* RW-9595M, hautement productrice en EPS, et sa souche "jumelle", *Lb. rhamnosus* ATCC 9595, non productrice d'EPS, ont été comparées quant à leur activité immunostimulante sur des splénocytes murins. Pour ce faire, des cellules spléniques, aussi appelées "splénocytes", de souris ont été incubées en présence de chacune de ces souches bactériennes, pour une durée définie. Les actions immunostimulantes ont été évaluées grâce au dosage de certaines cytokines présentes dans le surnageant des cellules stimulées.

La modulation de cytokines pro-inflammatoires, soit le TNF et l'IL-6, a été d'abord évaluée. Les deux souches de bactéries étudiées se sont montrées capables d'activer la transcription du gène du TNF chez les splénocytes (tableau I) de façon semblable. En effet, le niveau d'expression du gène du TNF n'est pas significativement différent ($p > 0,05$) chez les splénocytes stimulés avec *Lb. rhamnosus* ATCC 9595 et avec *Lb. rhamnosus* RW-9595M. Au contraire, en ce qui concerne la sécrétion de TNF, *Lb. rhamnosus* ATCC 9595 s'avère beaucoup plus actif que RW-9595M, qui n'induit pratiquement pas de sécrétion de TNF (figure 4). La faible sécrétion de TNF par les splénocytes stimulés avec la souche mucoïde RW-9595M pourrait s'expliquer par un effet protecteur des EPS, par la formation d'une enveloppe autour de la bactérie, ce qui la protégerait contre les attaques des macrophages. Un tel phénomène a déjà été décrit comme étant à l'origine de la virulence de certains pathogènes (Pedersen *et al.*, 1990 ; Weiner *et al.*, 1995 ; Lagacé et Dubreuil, 1999 ; Yu *et al.*, 1999). Bien que l'expression du gène du TNF soit activée, il ne semble pas y avoir de TNF bioactif de sécrété. Il pourrait tout de même y avoir sécrétion de TNF, mais sous une forme biologiquement inactive. En effet, les monomères de TNF matures possèdent un poids moléculaire de 17,5 kDa. Cependant, il est possible de rencontrer des monomères de TNF de 18,5 kDa; ceux-ci ont 10 acides aminés supplémentaires et sont biologiquement inactifs (Cseh et Beutler, 1989). De plus, les monomères de TNF s'associent en trimères stables, qui se lient aux récepteurs cellulaires et induisent de nombreuses réponses à l'origine des effets

inflammatoires du TNF (Smith et Baglioni, 1987 ; Hlodan et Pain, 1995). La non-trimérisation des molécules de TNF empêcherait donc la liaison aux récepteurs cellulaires. Une autre possibilité serait la sécrétion de grandes quantités de TNFRs sous forme soluble; qui sont les inhibiteurs naturels du TNF (Nophar *et al.*, 1990). Le TNF, bien que souhaitable en faible quantité au site même d'une infection, peut devenir très dangereux s'il est sécrété en grande quantité et/ou de façon généralisée dans l'organisme. Cette condition pathologique est connue sous le nom de "choc septique" et peut se solder par la mort de l'individu affecté (Cavaillon, 1993). Étant donné la grande toxicité du TNF, il serait plus souhaitable, pour l'individu désirant consommer des produits probiotiques, d'utiliser une souche bactérienne limitant l'induction de sa sécrétion. Ainsi, la souche RW-9595M serait une meilleure candidate que la souche ATCC 9595 en tant qu'additif dans des produits "santé" (yogourts, laits fermentés), puisqu'elle n'induit qu'une très faible sécrétion de TNF.

La sécrétion d'IL-6 par les splénocytes stimulés avec les deux souches de bactéries étudiées s'est avérée comparable, puisqu'aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été observée entre les deux souches. La production d'IL-6 indique une capacité de stimuler les lymphocytes B. Bien que la sécrétion d'IL-4 caractérise une réponse de type Th2, aucune activation de l'expression du gène de cette cytokine n'a jamais pu être mise en évidence (résultats non montrés). Il serait facile de prétendre que l'activation de l'expression des gènes des cytokines typiques d'une réponse Th1, antagoniste à Th2, puisse être à la source de l'absence de stimulation du gène de l'IL-4. Cependant, aucune expression du gène de l'IL-12 n'a été observée, non plus, dans le contexte des deux souches de bactéries testées ici. L'IL-12 est importante pour la différenciation des lymphocytes Th0 en Th1 et il aurait été attendu que le gène de l'IL-12 soit stimulé, car l'orientation Th1 est le profil par défaut adopté par les splénocytes de souris C57BL/6 (Kelso *et al.*, 1991 ; Leclerc, 1993). L'absence d'activation observée du gène de l'IL-12 pourrait provenir du fait que les amorces utilisées n'étaient peut-être pas adéquates. Par exemple une structure particulière en boucle ou une portion plus ou moins accessible dans la séquence de l'amorce pourrait gêner ou empêcher l'hybridation des amorces sur l'ADNc à amplifier. La même explication pourrait s'appliquer aux amorces de l'IL-4.

L'emploi d'une technique différente, comme l'ELISA ou un bio-essai, pourrait permettre de vérifier si l'absence de stimulation de l'expression du gène de l'IL-12 signalée ici découle d'une réalité factuelle ou tire plutôt son origine d'une défectuosité technique, comme cela semble être le cas avec les splénocytes stimulés avec les fractions d'EPS (voir le point 3, plus loin).

En raison de la très grande variabilité introduite durant les nombreuses étapes de manipulations, la technique de RT-PCR, telle qu'utilisée ici pour mesurer le niveau d'expression des gènes de cytokines, doit être considérée comme un outil de mesure qualitative, plutôt que quantitative. La procédure est très longue et repose sur plusieurs facteurs limitants (activité des enzymes, température, spécificité des amorces, dégradation de l'ARN, etc.), en plus de donner des résultats variables et de nécessiter plusieurs reprises avant d'obtenir des résultats satisfaisants. C'est pourquoi, tout au long du projet, le RT-PCR a été utilisé dans un but de caractérisation strictement qualitative. Les bio-essais ont été privilégiés, lorsqu'ils étaient disponibles. La technique de bio-essai du TNF, utilisée pour mesurer sa sécrétion, reflète en réalité la quantité de TNF **bio-actif** présent dans le surnageant des splénocytes, c'est-à-dire que les interactions avec d'autres molécules agissant en synergie ou en opposition (antagonistes) ne sont pas décelables. C'est donc la résultante de l'action de plusieurs facteurs qui est effectivement mesurée.

Aucune différence n'a été observée entre les deux souches de lactobacilles lors de l'analyse de l'**expression** du gène de l'IFN- γ , chez les splénocytes incubés en présence des bactéries ($p > 0,05$) (tableau I). Dans le même ordre d'idée, la **sécrétion** d'IFN- γ n'est pas non plus significativement différente pour les splénocytes stimulés avec *Lb. rhamnosus* ATCC 9595 et RW-9595M ($p > 0,05$). L'IFN- γ est une cytokine importante de l'orientation Th1. Aussi, comme l'orientation Th1 est l'orientation prise par défaut par les splénocytes des souris C57BL/6, il était attendu que l'IFN- γ soit sécrété en quantité importante. L'IFN- γ étant un antagoniste de la réponse de type Th2, cette cytokine pourrait revêtir une certaine importance dans le maintien du bien-être du consommateur recherchant des aliments probiotiques, car l'IFN- γ pourrait contribuer à inhiber certaines réactions de type allergique exercées par les IgE (Erb *et al.*, 1998 ; Shida *et al.*, 1998).

Ainsi, les deux souches de lactobacilles testées semblent également capables d'induire la sécrétion de l'IFN- γ et de ce fait, constitueraient de bons choix en tant qu'additifs pour le yogourt et les laits fermentés.

2. Purification et fractionnement des EPS

Le contenu protéique des EPS isolés à l'éthanol 95% se situe à environ 2,3%, tandis que celui des EPS purifiés au TCA 10%, est d'environ 1,3% (appendice E). L'analyse élémentaire des EPS produits par *Lb. rhamnosus* RW-9595M démontre l'absence d'azote, et par le fait même, l'absence de protéines intrinsèques au polymère (Dr M.-R. Van Calsteren, communication personnelle). Or, le contenu en protéines des EPS purifiés (1,3%) aurait dû refléter cette absence de protéines. Cependant, étant donné que l'absorbance lue (0,105) se situait à la limite de détection recommandée par le fabricant du colorant utilisé lors du dosage des protéines (les valeurs d'absorbance entre 0,1 et 0,9 sont celles situées dans la portion linéaire de la courbe), la valeur obtenue n'est probablement pas significative. Par contre, pour les échantillons résultants des filtrations successives (F4), aucune trace de protéine n'a été décelée.

Lb. rhamnosus RW-9595M est une souche exceptionnellement productive et peut atteindre jusqu'à 1200 mg/L en conditions optimales de croissance. Cependant, le rendement obtenu ici se situait à environ 200 mg/mL (appendice D). Des pertes accidentelles d'EPS ont pu survenir durant les nombreuses étapes d'isolement, de purification et de fractionnement. Notre objectif était d'obtenir avant tout des EPS possédant un degré de pureté suffisant pour effectuer des stimulations du système immunitaire, et non d'optimiser la production des EPS. Néanmoins, le rendement obtenu se situe dans la moyenne de productivité des souches de bactéries lactiques productrices d'EPS (Cerning, 1990 et 1994).

Les filtrations successives sur membranes ont donné quatre fractions d'EPS. La première (F1), avec un poids moléculaire supérieur à 1000 kDa, contient la majorité des EPS, soit environ 50,7% (appendice D). Les fractions 2 et 3 (F2 et F3) représentent respectivement 2,7 et 6,6% des EPS entiers. La fraction 4 (F4), représente quant à elle seulement 2,4%

des EPS. De plus, cette dernière a une apparence différente de celle des trois premières. Alors que F1, F2 et F3 ont une texture floconneuse et une couleur blanc crème, F4 est de couleur brunâtre et démontre une texture plutôt gommeuse. F4 contient probablement des résidus divers provenant des différentes étapes d'isolement et de purification. Il est à noter que les pourcentages énumérés ci-haut représentent le rendement d'EPS récupérés (quantité d'EPS recueillis à la fin de l'opération de filtration par rapport à la quantité d'EPS initiale au début de l'opération). La somme des pourcentages calculés est inférieure à 100%, ce qui reflète les pertes associées aux manipulations inhérentes aux trois passages sur les membranes de filtrations.

La répartition des fractions telle que présentée dans l'appendice D ne correspond pas à la distribution théorique, obtenue par HPLC (figure 7). La proportion exacte de chaque fraction aurait pu être déduite à partir du calcul de l'aire sous la courbe, opération qui peut facilement être calculée à l'aide d'un logiciel spécifique. Selon cette figure, la proportion représentée conjointement par F2 et F3 auraient dû représenter une plus grande proportion des EPS (basé sur la mesure de l'aire sous la courbe), par rapport à la proportion représentée par F1. Le fait est que lors du passage sur membrane, surtout celle de 1000 kDa, il a pu se produire un colmatage, en raison de la très grande viscosité de la solution d'EPS. En effet, malgré une dilution importante de la solution, plusieurs lavages consécutifs et l'emploi de la pression maximale recommandée pour les chambres à filtration utilisées, l'écoulement de la solution d'EPS demeurait très difficile. Un colmatage de la membrane expliquerait pourquoi les proportions des fractions subséquentes sont plus faibles que prévu. Ceci signifierait aussi que F1 contiendrait en réalité un peu de F2 et F3, dont les molécules se seraient retrouvées avec les hauts poids moléculaires contenus dans F1. Un phénomène de dépolymérisation, par un mécanisme auto-catalytique dû à la présence du groupement acide dans la molécule de polymère, a pu se produire spontanément et mener à la présence de fragments de poids moléculaires inférieurs dans la fraction F1 (Dr Marie-Rose Van Calsteren, communication personnelle). Bien que F1 ne soit peut-être pas aussi homogène que prévu, F2 et F3 sont censées ne contenir que les poids moléculaires escomptés, car les solutions d'EPS filtrées dans ces cas n'étaient pas aussi visqueuses que la solution initiale, et la pression exercée

était cette fois suffisante pour la faire passer facilement à travers la membrane. Afin d'éviter ces problèmes inhérents à la très grande viscosité de la solution d'EPS, il serait peut-être plus prudent d'effectuer un fractionnement en utilisant une technique de tamisage moléculaire afin d'obtenir des fractions plus homogènes que celles obtenues ici.

Le profil obtenu par HPLC montre deux populations principales, l'une avec un maximum d'environ 2000 kDa et l'autre avec un maximum d'environ 180 kDa. Des EPS formés de polymères dont le profil de poids moléculaire montre deux fractions principales ont déjà été observés chez *Bifidobacterium longum* (360 kDa et 1200 kDa) (Abbad Andaloussi *et al.*, 1995) et chez *Streptococcus thermophilus* LY03 (410 kDa et 1800 kDa) (Degeest et De Vuyst, 1999). Pour ce dernier, les deux fractions possédaient exactement la même composition monomérique, et les auteurs ont proposé que la "petite" fraction représenterait un produit de dégradation de la "grande" fraction. Dans notre cas, le milieu a subi un traitement thermique afin d'inactiver les glycohydrolases dès sa sortie des fermenteurs, après 24 heures d'incubation. Cependant, les glycohydrolases ont pu commencer à exercer leur action un peu plus tôt, ce qui pourrait expliquer la présence de la fraction de plus petit poids moléculaire, si elle résulte effectivement de la dégradation enzymatique des polymères de la fraction de haut poids moléculaire.

3. Activité immunomodulatrice des EPS

Les trois premières fractions, F1, F2 et F3, stimulent de façon significative ($p \leq 0,05$ ou $p \leq 0,01$) la prolifération cellulaire de certains splénocytes (tableau II). F1 possède même une action mitogénique très proche de celle observée avec le témoin positif LPS. Étant donné que le LPS est un mitogène reconnu des lymphocytes B murins (Zubler *et al.*, 1987), nous avons émis l'hypothèse que la prolifération observée était due à la prolifération de certains lymphocytes B. Cette hypothèse a été vérifiée en utilisant la cytofluorométrie. Les splénocytes stimulés ont été incubés en présence d'un anticorps spécifique aux IgG (marqueur de lymphocytes B) marqué à la fluorescéine, puis dénombrées à l'aide du cytofluoromètre. Les splénocytes en division ont été sélectionnés sur la base de leur volume cellulaire, qui est le double de celui des lymphocytes au repos, tel qu'indiqué sur l'axe "FS" ("forward scattering"). Dans cette zone définie, la proportion de cellules positives à l'anticorps anti-IgM, c'est-à-dire fluorescentes, été comptabilisée. Après 24 à 48 h de stimulation avec F1 et F2, la proportion de cellules B au sein de la population de splénocytes en division est bien visible. À la fois F1 (figure 8a) et F2 (figure 8b) sont capables d'augmenter la capacité de division des lymphocytes B, par rapport au témoin cellulaire qui consistait en splénocytes non stimulés. L'effet de F1, après 48 h de stimulation, est celui qui se rapproche le plus de l'effet du LPS. Ainsi, selon les résultats obtenus en cytofluorométrie, la majorité des cellules en prolifération sous l'action de F1 seraient des lymphocytes B.

Étant donné la quantité réduite de F2 et F4, et l'action plus faible de F3, les expériences ultérieures ont été réalisées avec seulement F1 et les EPS entiers (non fractionnés) en parallèle.

Aucune sécrétion de TNF par les splénocytes de souris C57BL/6 stimulés avec les EPS entiers, ou avec F1 n'a pu être décelée. Ceci corrobore les résultats obtenus avec les bactéries entières. La souche mucoïde n'induisait en effet pratiquement pas de sécrétion de TNF, ceci possiblement en raison d'un effet protecteur des EPS autour de la bactérie, qui la protègent contre les attaques des macrophages. Par contre, la lignée de

macrophages murins RAW 264.7 a fortement répondu en sécrétant une quantité appréciable de TNF (Tableau III). Les splénocytes isolés dans la rate des souris comprennent une vaste diversité de cellules immunocompétentes, dont des macrophages, des lymphocytes et des plusieurs autres types de cellules. Les macrophages sont les principales cellules sécrétrices de TNF, et leur proportion dans la rate est relativement plus faible que celle des autres types cellulaires, comme par exemple, les lymphocytes. D'autre part, la lignée cellulaire RAW 264.7 est une lignée pure de macrophages murins, et par ce fait même plus riche en macrophages que ne l'est une rate de souris, quel qu'en soit le génome. Ceci pourrait donc facilement expliquer la quantité appréciable de TNF sécrété par cette lignée cellulaire, par rapport aux valeurs, plus faibles, obtenues avec les splénocytes des trois souches de souris testées. Afin de vérifier l'hypothèse que les EPS puissent interférer dans le processus de phagocytose, un simple test de phagocytose comparant des cellules provenant des diverses souches de souris et de la lignée RAW 264.7, incubées avec et sans EPS, aurait permis d'approfondir davantage cet aspect. Cependant, le nombre limité de souris disponibles appartenant aux souches BALB/c et *nude* n'a pas permis de réaliser cette expérience.

La sécrétion d'IL-6 indique une possibilité de stimulation des lymphocytes B. F1 induit la sécrétion d'IL-6 par des splénocytes de souris C57BL/6, mais encore plus fortement de souris BALB/c et surtout de souris *nude* (figure 9). Les souris *nude* sont déficientes en lymphocytes T. Il est possible qu'un phénomène de compensation se produise et que la production d'IL-6 soit très forte, ceci afin de stimuler davantage les lymphocytes B. Les splénocytes de souris BALB/c adoptent par défaut une orientation de type Th2, contrairement à ceux des souris C57BL/6 qui adoptent plutôt une orientation de type Th1 (Cavaillon, 1993). Ceci pourrait suggérer que la quantité d'IL-6 produite est définie génétiquement chez ces souris. Dans le même ordre d'idée, chez les splénocytes de souris C57BL/6, qui prennent plutôt une orientation de type Th1, il est possible que les lymphocytes B soient faiblement stimulés, du fait d'une capacité restreinte de production d'IL-6, qui pourrait très bien être déterminée génétiquement. Il est intéressant de noter le fait que la sécrétion d'IL-6 par les splénocytes stimulés avec les EPS entiers suit la même tendance que pour les splénocytes stimulés avec F1, mais les valeurs sont généralement un

peu plus faibles. Si F1 contient effectivement un peu des fractions subséquentes (voir la section 2 sur la purification et le fractionnement des EPS), F1 aurait une composition semblable à celle des EPS entiers, mais une concentration plus élevée en polymères de haut poids moléculaire. Ceci pourrait expliquer que la tendance soit la même pour les deux produits, mais que les valeurs soient plus fortes avec F1.

La sécrétion d'IL-12, précurseur d'une réponse immunitaire orientée Th1, a aussi été mesurée. Comme aucun bio-essai n'était disponible pour un dosage de cette cytokine chez la souris, un ELISA a donc été utilisé, afin de mesurer la quantité d'IL-12 p40 dans les surnageants des splénocytes des trois souches de souris stimulés avec F1 et les EPS entiers. Les niveaux d'IL-12 p40 sécrétée par les splénocytes de C57BL/6 et BALB/c, sous l'action des EPS, sont modérés (figure 10), par contre le niveau basal est relativement élevé. La souris C57BL/6 semble répondre légèrement plus fort au stimulus que la souris BALB/c. Ce phénomène est en accord avec l'orientation par défaut (Th1) adopté par les splénocytes des souris C57BL/6. Mais, une réponse très étonnante a été obtenue avec les souris *nude* : aucune sécrétion d'IL-12 p40 n'a été décelée, contrairement aux résultats obtenus avec les C57BL/6 et les BALB/c. Deux raisons pourraient expliquer ce résultat. L'IL-12 p40 ne serait peut-être pas du tout produite par les splénocytes de *nude*. D'autre part, l'IL-12 p40 pourrait être produite, mais en quantité très faible, et pourrait être consommée immédiatement, sous la forme du dimère actif, par des cellules porteuses du récepteur approprié, et de ce fait non détectée. D'autre part, l'IL-12 p40, qui peut se trouver à l'état libre, n'est pas la forme bioactive de la cytokine, mais un antagoniste du dimère actif. Une mesure de l'IL-12 p35, qui ne se trouve pas sous forme libre, mais seulement dans le dimère bioactif, aurait donc constitué une mesure plus fiable de l'IL-12 bioactive. Il est à noter que, comme lors des stimulations avec les bactéries entières, le RT-PCR n'a pas pu démontrer d'expression du gène de l'IL-12 (résultats non montrés), bien que les résultats de l'ELISA aient détecté la présence de la cytokine. Ceci semble plaider en faveur d'une défectuosité technique

L'expression du gène de l'IFN- γ est stimulée chez les splénocytes de souris C57BL/6 incubés en présence de F1 et des EPS entiers (figure 11). L'intensité des bandes

provenant des splénocytes stimulés avec F1 semble légèrement plus élevée que pour les splénocytes stimulés avec les EPS entiers. De plus, chez les trois souches de souris, une sécrétion d'IFN- γ peut être observée (figures 12 et 13) lorsque les splénocytes sont incubés en présence de F1. Comme pour toutes les mesures de cytokines précédentes, les valeurs obtenues avec les EPS entiers étaient généralement un peu plus faibles, mais suivaient la même tendance que celles obtenues avec F1. Il est surprenant de constater que les splénocytes de souris *nude* produisent de l'IFN- γ , alors qu'ils ne semblent produire aucune sécrétion d'IL-12. Autant pour les splénocytes de souris *nude* que pour ceux des autres souches de souris, aucune sécrétion d'IFN- γ n'était détectable après 6 heures de stimulation, ce qui semble exclure la possibilité d'activité des NK. Il reste une possibilité que l'IFN- γ soit produit par une sous-population de lymphocytes T non auxilliaires, comme par exemple des $\gamma\delta$ qui se situent surtout dans les tissus épithéliaux (épiderme, muqueuses intestinale et uro-génitale, tissu mammaire) et sont particulièrement abondants dans l'intestin, où ils se retrouvent sous la forme de lymphocytes intra-épithéliaux (Hayday, 2000). Les lymphocytes de type $\gamma\delta$ se retrouvent quelquefois dans les ganglions lymphatiques, la rate, les plaques de Peyer et le thymus (Hayday, 2000). L'orientation par défaut des lymphocytes $\gamma\delta$ retrouvés dans la rate est de type Th1 (Hayday, 2000). Bien que les souris *nude* ne possèdent qu'un thymus rudimentaire, une réponse T-dépendante a déjà été observée chez ces souris (McDonald *et al.*, 1987). Par ailleurs, la formation de lymphocytes T $\gamma\delta$ pourrait être possible chez les souris *nude*, puisque la formation de ce type de lymphocytes T survient très tôt durant le développement embryonnaire et a lieu dans l'épithélium extrathymique, contrairement aux lymphocytes T conventionnels ($\alpha\beta$) qui sont formés dans la médulla du thymus (Hayday, 2000). De plus, il existe des follicules dans le petit intestin qui pourraient, selon Matsuzaki *et al.* (1996) supporter le développement de lymphocytes T $\gamma\delta$. Ces cellules possèdent plusieurs récepteurs et reconnaissent une panoplie d'antigènes : bactéries parasites intracellulaires, glycoprotéines virales, protéines de choc thermique. La réponse des cellules $\gamma\delta$ est peut-être dirigée contre un signal de "stress" cellulaire, plutôt que contre un épitope antigénique particulier (Hayday, 2000). Une autre possibilité serait que la production d'IFN- γ par les souris *nude* résulte de la stimulation des cellules B par l'IL-

18. Mais ceci requiert la présence d'IL-12 (Okamura *et al.*, 1998), ce qui n'est pas le cas ici, car l'IL-12 p40 n'a pu être détectée (figure 10). Aussi, en l'absence d'expériences supplémentaires, ce résultat demeure inexpliqué.

D'autre part, le RT-PCR n'a pas permis de mettre en évidence l'expression du gène de l'IL-4, comme dans le cas des stimulation avec les bactéries entières. Il se pourrait que l'expression de l'IL-4 soit inhibée par la sécrétion d'IFN- γ , car la réponse Th1 est antagoniste à la réponse Th2. Enfin, il est aussi possible que les amorces n'étaient pas tout à fait adéquates.

Un autre point intéressant est l'indépendance observée entre la production de l'IL-12 et celle de l'IFN- γ . Pendant que la production d'IL-12 p40 semble demeurer constante, celle d'IFN- γ augmente de façon dose dépendante (tableau IV). L'IL-12 stimule les cellules NK à produire de l'IFN- γ . Ainsi, la détection d'IFN- γ après une courte stimulation aurait pu être le signe d'une activité des NK, mais ce n'était pas le cas ici, car aucune sécrétion de cette cytokine n'a été décelée après 6 heures de stimulation (figure 14). Une incubation minimale de 18 heures, et pour certaines concentrations, 24 heures avec F1 est requise pour engendrer la sécrétion d'IFN- γ à un niveau détectable. Après 48 heures d'incubation, un plateau est observé et se maintient au-delà de 72 heures d'incubation. Ceci pourrait suggérer qu'il se produit une accumulation d'IFN- γ dans le surnageant, jusqu'à l'atteinte d'un point de saturation. Une incubation de plus longue durée aurait pu être réalisée pour vérifier la disparition d'IFN- γ dans le milieu extracellulaire des splénocytes, mais après 72 heures, la viabilité des cellules pourrait être grandement affectée.

Plusieurs EPS possédant une activité immunomodulatrice ont été rapportés dans la littérature, mais ceux-ci possèdent souvent des groupements divers reliés à leur structure d'hydrates de carbone : ces groupements peuvent être de nature aminée (Wang *et al.*, 1998 ; Li *et al.*, 1998), lipidique (Zubler *et al.*, 1987), phosphatée (Kitazawa *et al.*, 1991b ; Kitazawa *et al.*, 1993) ou sulfatée (Daniels *et al.*, 1994). Il est difficile dans ces cas de déterminer si l'activité immunomodulatrice est due ou non à ces groupements. Les EPS

produits par RW-9595M ne possèdent aucun lipide, et l'analyse élémentaire ne montre aucun phosphore, soufre ou azote (Dr Marie-Rose Van Casteren, communication personnelle). L'activité observée semble donc bien le fait de la structure d'hydrates de carbone seulement. Dans la littérature, seulement quelques polysaccharides possédant une structure monomérique exempte d'autres groupements ont démontré des activités immunostimulantes. Il s'agit, entre autres, d'un β -glucan isolé à partir de l'avoine qui stimule la production d'IL-1, de TNF- α (très faible quantité), d'IL-2, d'IFN- γ et d'IL-4 par des cellules immunocompétentes de souris (Estrada *et al.*, 1997). Chez les EPS produits par RW-9595M, ce sont les polymères de haut poids moléculaire (F1) qui semblent responsables des activités immunostimulantes. Yamaoka *et al.* (1995) ont aussi observé que la fraction de haut poids moléculaire ($1,2 \times 10^5$ Da) d'un polysaccharide isolé du Shosaiko-to, un remède de la médecine chinoise traditionnelle, possède une activité stimulante sur les cellules NK, identique à celle obtenue avec les polymères non fractionnés. Des auteurs ont aussi rapporté une augmentation de l'immunogénicité, ou encore de la capacité immunostimulante, avec l'augmentation de la longueur de la chaîne des polysaccharides (Kabat et Bezer, 1958 ; Jouault *et al.*, 1995 ; Kalka-Moll *et al.*, 2000). En dépit d'une certaine activité mitogénique de F2 et F3, aucune sécrétion de cytokines n'a été détectée chez des splénocytes stimulés avec F2, F3 et F4, qui contiennent les polymères de plus faibles poids moléculaires.

Le rhamnose, aussi appelé 6-déoxy-mannose, possède une structure voisine de celle du mannose, et pourrait donc être reconnu par le même type de récepteur que ce dernier. D'ailleurs, Keisari *et al.* (1997) ont observé qu'une séquence particulière de Man2-3 α Man ou Rha2-3 α Rha du polysaccharide capsulaire de *Klebsiella pneumoniae* peut indifféremment être reconnue par le récepteur du mannose. Étant donné que le polymère synthétisé par *Lb. rhamnosus* RW-9595M est constitué de plusieurs monomères de rhamnose, nous avons procédé à des expériences de compétition pour les récepteurs de type mannose, en utilisant des concentrations croissantes de différents sucres simples ayant déjà démontré des propriétés inhibitrice de l'immunostimulation exercée par des polysaccharides. Il s'agissait du galactose-6-phosphate, du galactose-6-sulfate (Daniels *et al.*, 1994) et du pentaacétate de mannose (Zollner *et al.*, 1993). Cependant, nous n'avons

jamais observé une telle inhibition. Dans le cas du galactose-6-sulfate, le groupement sulfate est essentiel à la liaison au récepteur concerné (Daniels *et al.*, 1994). Quant au penta acétate de mannose, nous l'avons utilisé tel quel, alors que dans la référence (Zollner *et al.*, 1993), les groupements acétyles étaient hydrolysés à 40%. Il est possible que la conformation de la molécule entière soit différente et modifie l'affinité pour les récepteurs. Une autre possibilité est que les EPS soient reconnus par un autre type de récepteur, ou encore, que la présence d'un co-récepteur soit nécessaire à l'attachement des EPS au récepteur. L'identification du récepteur impliqué dans la reconnaissance des EPS produits par *Lb. rhamnosus* RW-9595M demeure une voie à explorer.

Conclusion

La comparaison de l'activité immunomodulatrice de deux souches de *Lactobacillus rhamnosus*, ATCC 9595 et RW-9595M, la première non-mucoïde et la seconde, mucoïde, sur des splénocytes de souris incubés en présence de différentes concentrations de ces bactéries, évaluée par dosage de différentes cytokines, a révélé que les deux souches sont capables d'induire la sécrétion d'IL-6, de même que d'IFN- γ par des splénocytes de souris stimulés. Cependant, *Lb. rhamnosus* RW-9595M possède un avantage sur *Lb. rhamnosus* ATCC 9595, car il induit une sécrétion limitée de TNF, ce qui rend cette souche moins toxique en vue d'une administration potentielle chez un être vivant, car le TNF en trop grande quantité et/ou produit de façon généralisée dans l'organisme peut s'avérer nocif, voire mortel. Cette faible quantité de TNF sécrété par les splénocytes stimulés avec *Lb. rhamnosus* RW-9595M est peut-être due à un effet protecteur des EPS, formant une enveloppe autour de la bactérie, ce qui pourrait la protéger contre les attaques des macrophages.

En ce qui concerne l'activité immunomodulatrice des EPS produits par *Lb. rhamnosus* RW-9595M, les EPS entiers, ainsi que la plupart des fractions obtenues par filtrations sur membranes, possèdent une certaine activité mitogénique qui semble s'exercer sur les lymphocytes B. Le dosage de différentes cytokines sécrétées a révélé que la fraction de plus haut poids moléculaire (F1), ainsi que les EPS entiers, exercent un effet immunostimulateur sur les splénocytes de souris qui est assez semblable à celui obtenu avec les bactéries entières. Il y a absence de sécrétion de TNF chez les souris C57BL/6, et une faible sécrétion chez les souris BALB/c et *nude* avec de fortes concentrations d'EPS. La lignée de macrophages murins RAW 264.7 répond quant à elle de façon très forte en sécrétant une quantité importante de TNF. La sécrétion de TNF dépend donc de l'origine des cellules stimulées avec les EPS. La sécrétion d'IL-6 varie aussi selon l'origine (souche de souris) des cellules stimulées, de même que la sécrétion d'IL-12. La production d'IFN- γ par les splénocytes de toutes les souches de souris étudiées semble indépendante de l'IL-12. Les résultats obtenus chez les souris *nude* (absence d'IL-12, et forte production d'IFN- γ en absence d'activité des NK), suggèrent un rôle possible d'un

type de lymphocytes T non auxilliaires, comme par exemple les $\gamma\delta$ qui peuvent parfois se retrouver dans la rate, ou encore une stimulation des lymphocytes B. Il faudra d'autres expériences pour éclaircir cette situation qui, pour le moment, paraît surprenante. La validation de l'hypothèse d'une activité des lymphocytes T de type $\gamma\delta$ serait une voie intéressante à explorer dans une perspective de continuation des travaux sur le sujet. De plus, les EPS ne semblent pas être reconnus par les récepteurs de type mannose. Le type de récepteur impliqué, ainsi que la nécessité possible d'un co-récepteur, dans le processus de reconnaissance des EPS produits par *Lb. rhamnosus* RW-9595M par les cellules du système immunitaire demeure encore obscur et reste à déterminer par la poursuite de recherches sur ce sujet.

Enfin, les effets immunostimulateurs des EPS entiers et F1 ont été testés sur des cellules mononucléées sanguines (PBMC) humaines (Appendice H). Les réponses générées sont très différentes de celles obtenues avec les splénocytes de souris : alors que chez la souris l'IFN- γ est sécrété en grande quantité, il semble y avoir une absence de sécrétion de cette cytokine chez l'humain. Est-ce que cette différence de réponse est de nature spécifique ou tissulaire? La réponse à cette question nécessite davantage d'expérimentations, et dépasse le cadre du présent projet de recherche.

Appendice A

Composition des solutions employées

Solution de vitamines pour milieu BMM

Solution d'eau stérile (100 mL) contenant :

Acide folique 10 mg

Acide nicotinique 100 mg

Acide pantothénique 100 mg

HCl pyridoxal 200 mg

Riboflavine 100 mg

Se conserve au frigo jusqu'à un mois maximum.

Solution saline

Mélange de NaCl 0,85% (8,5 g/L de NaCl) dans de l'eau distillée.

Milieu FACS pour cytofluorométrie

PBS pH 7,4 enrichi de sérum bovin fœtal (SBF) 1% et d'azoture de sodium (NaN_3) 0,5%.

Milieu RPMI 1640 complet

Milieu RPMI 1640 contenant 20 mM d'HEPES, 2 mM de L-glutamine et 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamycine.

Eau DEPC

Eau déionisée contenant 0,1% d'un mélange éthanol-10%DEPC. Faire stériliser cette solution.

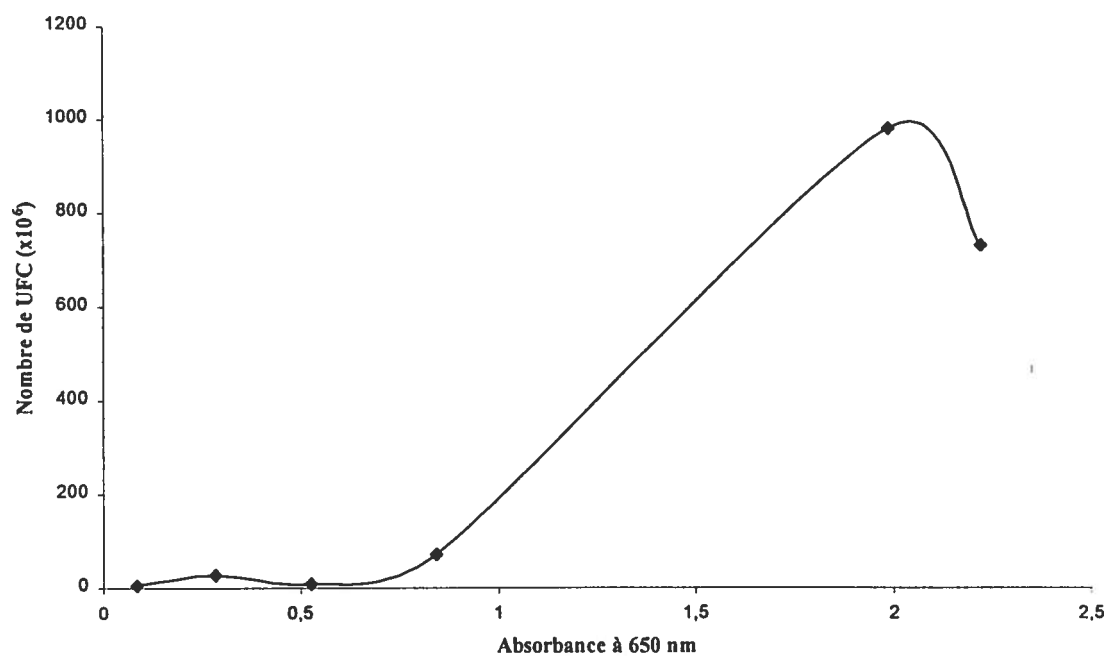
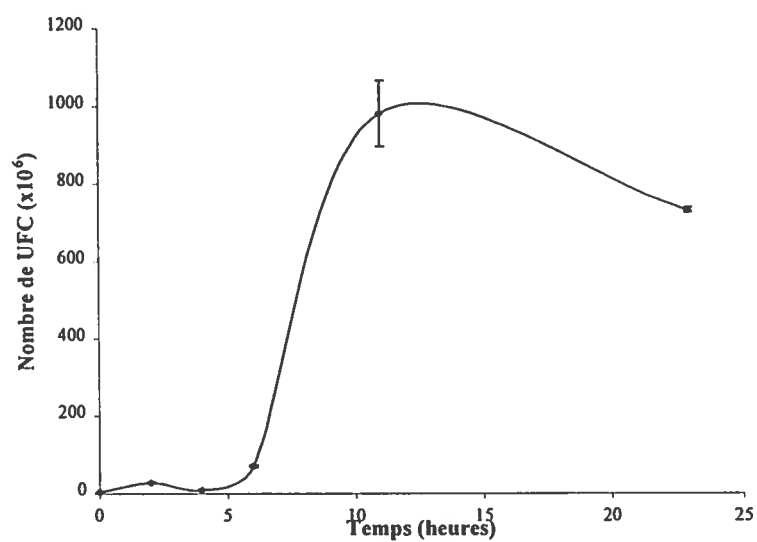
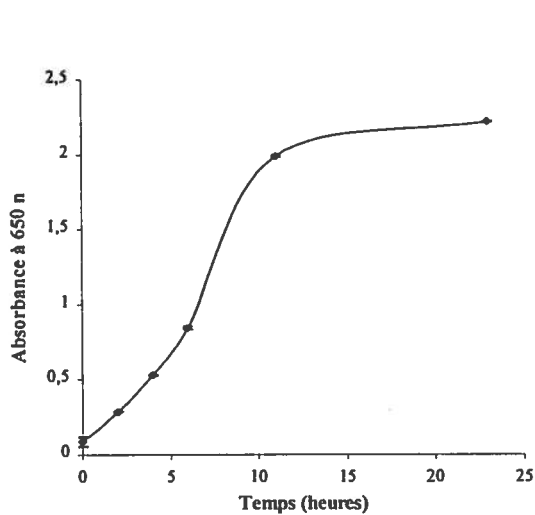
Réactif de Griess

Mélange en volumes égaux de chacune des solutions suivantes : Naphthylethylene diamine déhydrochloride 0,1% dans H_2O et Sulphanilamide 1% dans du H_3PO_4 5%.

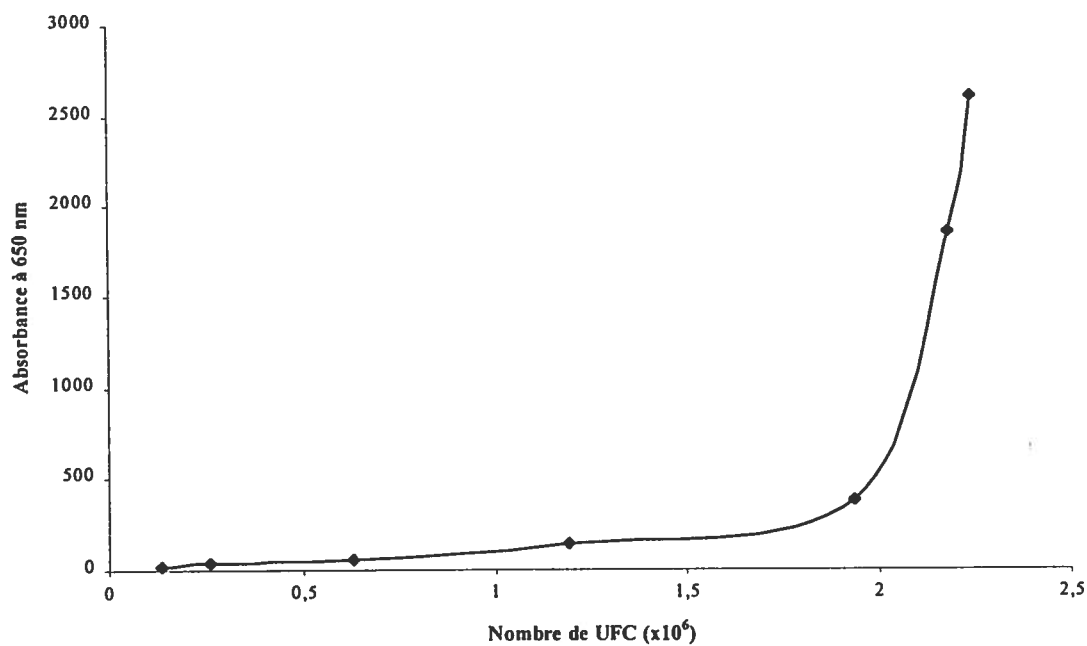
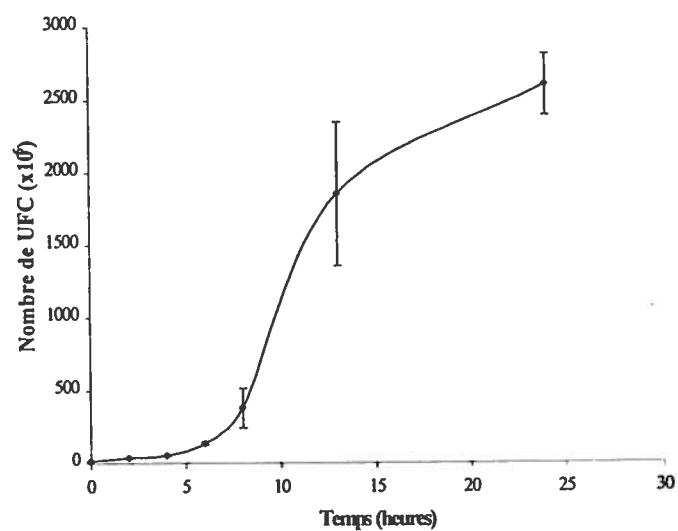
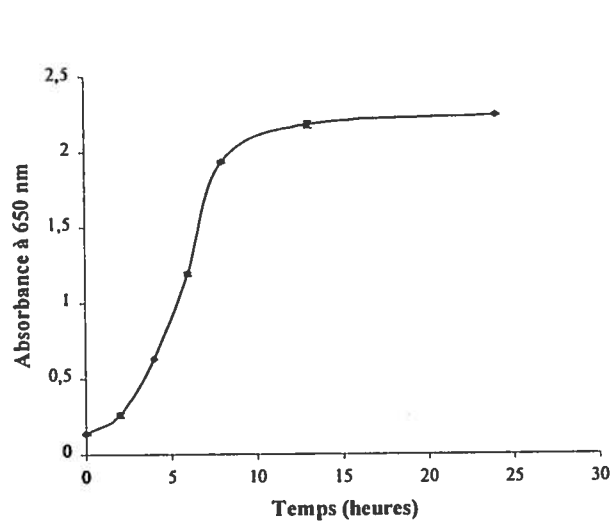
Appendice B

Courbes de croissance des bactéries

Courbes de croissance de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595



Courbes de croissance de *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M



Appendice C

Détermination de la dose d'irradiation pour les bactéries

Cette étape visait à déterminer la dose à utiliser pour neutraliser chaque souche bactérienne en vue des stimulations de splénocytes. Chaque souche a été inoculée à deux concentrations différentes, soit 5% et 10%, puis soumise à une dose de 3, 5 ou 7 kGy. Le compte bactérien a été effectué dans chaque cas.

a) pour *Lb. rhamnosus* ATCC 9595

Dose d'irradiation (kGy)	Compte bactérien (UFC/mL)	
	Inoculum 5%	Inoculum 10%
3	0	0
5	0	0
7	0	0

b) pour *Lb. rhamnosus* RW-9595M

Dose d'irradiation (kGy)	Compte bactérien (UFC/mL)	
	Inoculum 5%	Inoculum 10%
3	0	0
5	0	0
7	0	0

La plus petite dose inhibitrice de la croissance est de 3kGy, peu importe la souche et peu importe la concentration de l'inoculum de départ. C'est donc cette dose qui sera retenue pour la préparation des bactéries en vue des stimulations de splénocytes.

Appendice D

Rendement des EPS produits et récupérés

Étape	Produit total recueilli* (mg)	Volume initial de milieu de fermentation (L)	Rendement de produit recueilli (mg/L)
Isolation (précipitation à l'éthanol)	3731.3	4.2	888.4
Purification (précipitation TCA)	838.4		199.6

* poids sec

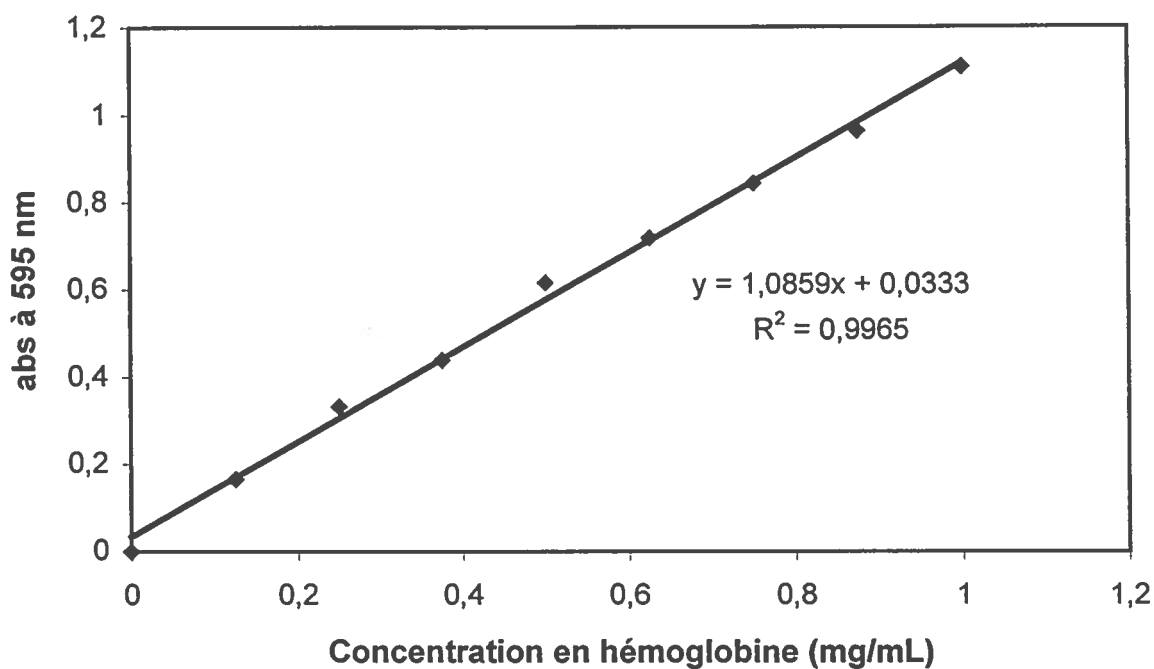
Fraction	Quantité recueillie* (mg)	Quantité initiale (mg)	Proportion des EPS entiers initiaux (%)
F1	234.6	463.1	50.7
F2	123		2.7
F3	30.7		6.6
F4	11.2		2.4
Total après filtration	399.5	463.1	86.3

* poids sec

Appendice E

Analyse du contenu protéique des EPS

Courbe standard de l'hémoglobine



Le contenu protéique des EPS, à diverses étapes de l'isolement et de la purification, a été déterminé à partir de la courbe de l'hémoglobine ci-dessus.

Échantillon	abs moyenne ^a	Concentration en protéines (mg/mL)	Proportion de protéines dans l'échantillon (%)
Après éthanol	0,179	0,1344	2,7
Après TCA	0,105	0,066	1,3
Après filtration (F4)	0,026	-	-

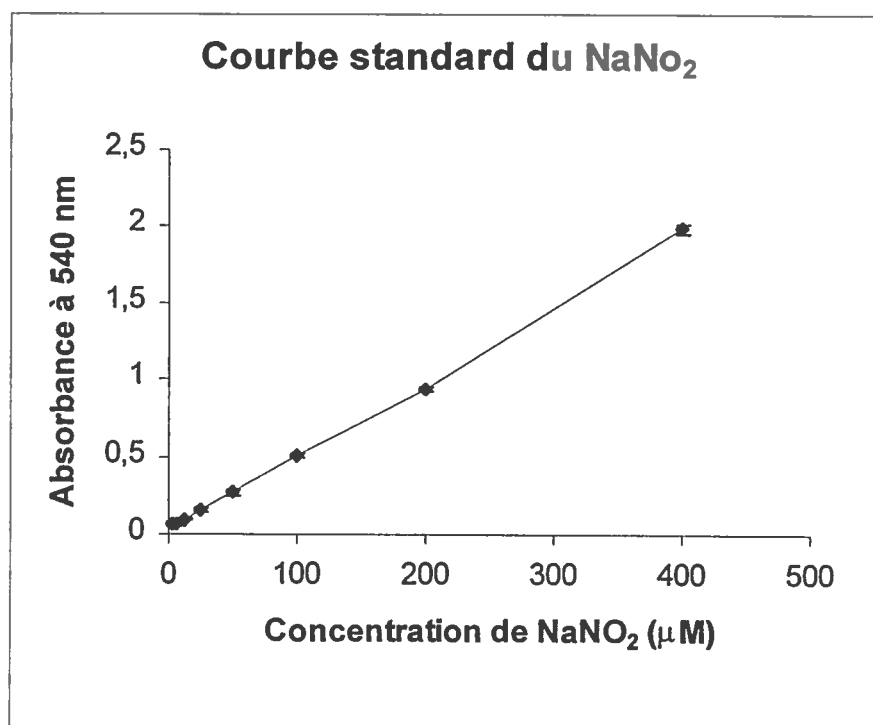
^a les limites d'absorption recommandées par le fabricant du colorant employé lors du dosage des protéines se situent entre 0,1 et 0,9, afin de demeurer dans la portion linéaire de la courbe.

Appendice F

Validation du bio-essai de l'IFN- γ

La validation du bio-essai a été réalisée sur deux expériences différentes, à l'aide d'un anticorps monoclonal (AcMo) de rat anti-IFN- γ de souris. Des échantillons ayant déjà répondu fortement auparavant (grande quantité d'IFN- γ sécrété) ont été sélectionnés. La validation a été effectuée en parallèle avec ces mêmes échantillons sans anticorps. Aucun échantillon n'a répondu lorsque l'anticorps était présent, validant ainsi le fait que la quantité de NaNO_2 est directement proportionnelle à la quantité d'IFN- γ .

Traitement	Concentration de F1 (ou ConA) (ng/mL)	Quantité de NaNO_2 (μM)	
		sans AcMo	avec AcMo
F1	2500	$26,8 \pm 18,4$	0
	5000	$26,8 \pm 5,9$	0
	10000	$30,0 \pm 3,8$	0
ConA	5000	$42,5 \pm 7,7$	0



Appendice G

Analyses statistiques et compilation des données

1. Sécrétion de TNF par des splénocytes de C57BL/6 stimulés avec *Lb. rhamnosus* ATCC 9595 et RW-9595M (n=6) (Fig. 4).

Souche	Concentration (UFC/mL)	Sécrétion moyenne (unités/mL)	Écart-type
ATCC 9595	1×10^6	40,3	15,1
	1×10^7	56,3	14,2
	1×10^8	49,8	5,5
RW-9595M	1×10^6	0	0
	1×10^7	1,2	2,9
	1×10^8	1,3	4,1

ANOVA

Facteur	Somme des carrés	Degré de liberté (dl)	Moyenne des carrés	p=
Concentration	1233,9	2	616,9	0,058
Souche	21316,1	1	21316,1	0,000
Concentration * souche	264,2	2	132,1	0,527

Pas d'effet de la concentration, ni d'interaction concentration*souche ($p > 0,05$). Effet significatif de la souche bactérienne ($p \leq 0,05$).

À l'intérieur de chaque concentration, un test de *t* de Student a été fait afin de voir l'effet de la souche.

Concentration (UFC/mL)	t	dl	p=
1×10^6	6,551	5	0,001
1×10^7	5,210	16	0,000
1×10^8	6,006	15	0,000

Il y a une différence significative entre les souches dans tous les cas.

2. Sécrétion d'IFN- γ par des splénocytes de C57BL/6 stimulés avec *Lb. rhamnosus* ATCC 9595 et RW-9595M (n=6) (Fig. 5).

Souche	Concentration (UFC/mL)	Sécrétion moyenne (μ M)	Écart-type
ATCC 9595	1×10^6	22,1	3,8
	1×10^7	17,8	3,0
	1×10^8	13,7	4,8
RW-9595M	1×10^6	15,6	4,3
	1×10^7	17,8	5,0
	1×10^8	16,0	3,6

ANOVA

Facteur	Somme des carrés	dl	Moyenne des carrés	p=
Concentration	103,8	2	51,9	0,251
Souche	61,3	1	61,3	0,201
Concentration * souche	20,1	2	10,1	0,757

Pas d'effet de la concentration, ni de la souche bactérienne, ni d'interaction concentration*souche ($p > 0,05$).

3. Sécrétion d'IL-6 par des splénocytes de C57BL/6 stimulés avec *Lb. rhamnosus* ATCC 9595 et RW-9595M (n=2) (Fig.6).

Souche	Concentration (UFC/mL)	Sécrétion moyenne (unités/mL)	Écart-type
ATCC 9595	1×10^6	76,0	0
	1×10^7	85,0	4,2
	1×10^8	85,5	0,7
RW-9595M	1×10^6	71,0	14,1
	1×10^7	71,0	11,3
	1×10^8	97,5	0,7

Un test de *t* de Student (comparaison par paires) a été fait avec Microsoft Excel 97, afin de comparer les sécrétions d'IL-6 induites par les deux souches bactériennes. Aucune différence significative entre les souches ($p=0,788$).

4. Sécrétion d'IFN- γ par des splénocytes de C57BL/6 stimulés avec F1, F2 et les EPS entiers (n=5) (Fig. 12).

Fraction	Concentration (ng/mL)	Sécrétion moyenne (fois) ^a	Écart-type
F1	2500	0,47	0,23
	5000	0,62	0,03
	10000	0,71	0,14
F2	2500	0	0
	5000	0	0
	10000	0,19	0,14
EPS entiers	2500	0,010	0,008
	5000	0,08	0,04
	10000	0,22	0,07

^a Les valeurs sont exprimées en considérant le contrôle positif (LPS) comme "1".

ANOVA

Facteur	Somme des carrés	dl	Moyenne des carrés	p=
Concentration	0,08905	2	0,04452	0,146
Fraction	2,173	2	1,087	0,000
Concentration * fraction	0,01391	4	0,003477	0,955

Pas d'effet de la concentration, ni d'interaction concentration*fraction ($p > 0,05$). Effet significatif de la fraction ($p \leq 0,05$).

Un test de comparaison multiple (LSD) a été fait sur chaque fraction, comparée à chacune des deux autres.

Fraction (I)	Fraction (J)	Différence de moyennes (I-J)	p=
F1	F2	0,5004	0,000
	EPS entiers	0,5212	0,000
F2	F1	-0,5004	0,000
	EPS entiers	0,02079	0,760
EPS entiers	F1	-0,5212	0,000
	F2	-0,02079	0,760

Différence significative entre F1 et F2 ($p \leq 0,05$), et entre F1 et les EPS entiers ($p \leq 0,05$).

Pas de différence significative entre F2 et les EPS entiers ($p > 0,05$).

5. Sécrétion d'IL-6 par des splénocytes de C57BL/6 stimulés avec F1, F2 et les EPS entiers (n=5).

Fraction	Concentration (ng/mL)	Sécrétion moyenne (fois) ^a	Écart-type
F1	2500	0,88	0,10
	5000	0,90	0,09
	10000	0,97	0,12
F2	2500	0,73	0,12
	5000	0,77	0,12
	10000	0,87	0,19
EPS entiers	2500	0,81	0,02
	5000	0,870	0,004
	10000	0,99	0,05

^a Les valeurs sont exprimées en considérant le contrôle positif (ConA) comme "1".

ANOVA

Facteur	Somme des carrés	dl	Moyenne des carrés	p=
Concentration	0,09295	2	0,04647	0,081
Fraction	0,118	2	0,05905	0,044
Concentration * fraction	0,008258	4	0,002064	0,973

Pas d'effet de la concentration, ni d'interaction concentration*fraction ($p > 0,05$). Effet significatif de la fraction ($p \leq 0,05$).

Un test de comparaison multiple (LSD) a été fait sur chaque fraction, comparée à chacune des deux autres.

Fraction (I)	Fraction (J)	Différence de moyennes (I-J)	p=
F1	F2	0,1263	0,013
	EPS entiers	0,02506	0,683
F2	F1	-0,1263	0,013
	EPS entiers	-0,1012	0,127
EPS entiers	F1	-0,02506	0,683
	F2	0,1012	0,127

Différence significative entre F1 et F2 ($p \leq 0,05$). Pas de différence significative entre F2 et les EPS entiers ($p > 0,05$), et entre F1 et les EPS entiers ($p > 0,05$).

6. Résultats des expériences ne comportant qu'une seule répétition.

Mesures de densitométrie des gènes de GAPDH, de TNF et d'IFN- γ provenant de splénocytes de C57BL/6 stimulés avec les souches de bactéries (Tableau I)

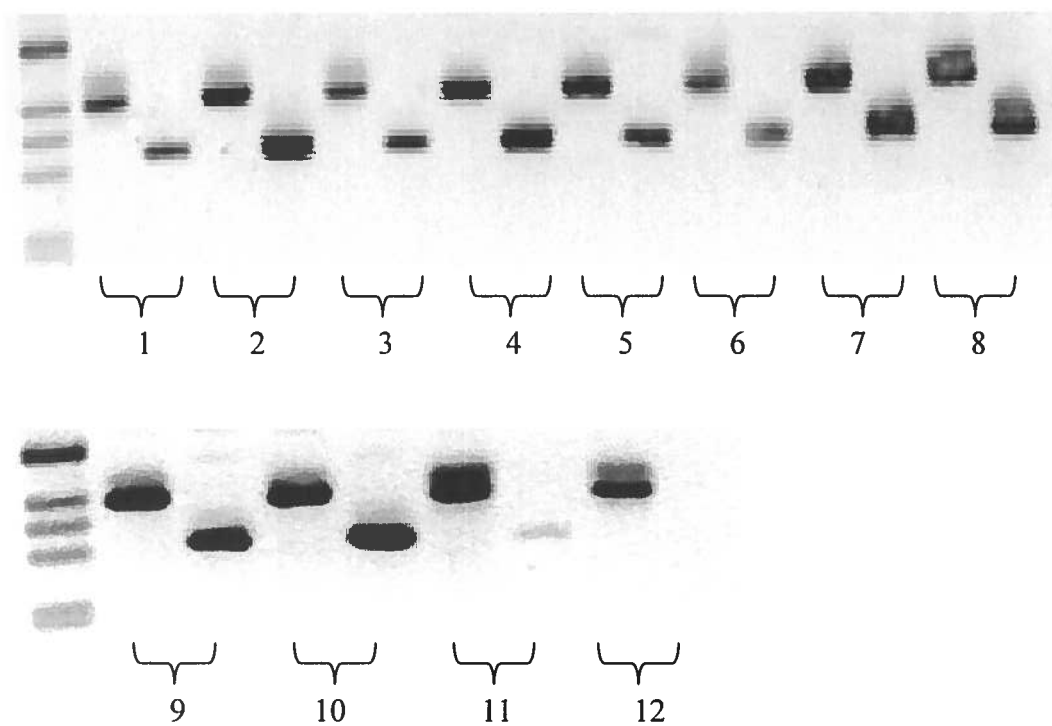
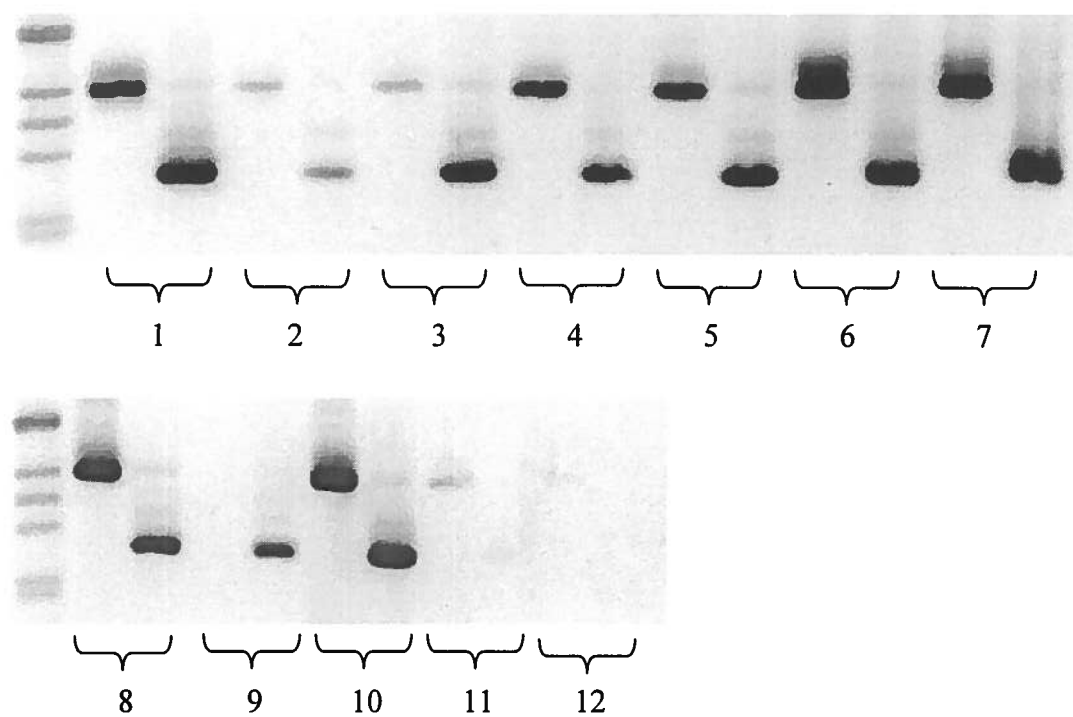
Traitement	Concentration (UFC/mL)	Intensité du gène du TNF (compte de densité)	Intensité du gène de l'IFN- γ (compte de densité)
Contrôle cellulaire	-	14358	0
ATCC 9595	1×10^6	16681	25066
	1×10^7	35896	28364
	1×10^8	24493	20449
RW-9595M	1×10^6	17737	22208
	1×10^7	16259	21768
	1×10^8	19004	20669
LPS	-	20270	-
ConA	-	-	21108
GAPDH* (n=6-7)	-	21115 $\pm$ 1928	21988 $\pm$ 1977

- Le gène de la GAPDH est utilisé comme gène de référence ("housekeeping gene"), car son expression demeure constante, peu importe le traitement appliqué à la cellule. Pour cette raison, à chaque temps d'incubation (6h=TNF et 24h=IFN- γ), une mesure moyenne de densitométrie de ce gène a été utilisée.

La figure suivante montre les résultats de l'électrophorèse des produits de PCR qui ont servi à établir les valeurs de densitométrie présentées dans le tableau précédent. La bande la plus haute correspond à l'expression du gène de référence, la GAPDH, tandis que la bande du bas correspond à l'expression du gène de la cytokine d'intérêt, soit le TNF en a), et l'IFN- γ en b). Les chiffres réfèrent au type de traitement subi par les splénocytes lors de la stimulation : 1=*L. rhamnosus* ATCC 9595, 1×10^6 bact./mL; 2= *L. rhamnosus*

ATCC 9595, 1×10^7 bact./mL; 3= *L. rhamnosus* ATCC 9595, $1 \times 10^{5=}$ bact./mL; 4= surnageant de culture de *L. rhamnosus* ATCC 9595; 5= *L. rhamnosus* RW-9595M, 1×10^6 bact./mL; 6= *L. rhamnosus* RW-9595M, 1×10^7 bact./mL; 7= *L. rhamnosus* RW-9595M, 1×10^8 bact./mL; 8= surnageant de culture de *L. rhamnosus* RW-9595M; 9= milieu de culture des bactéries (MRS); 10= LPS (en a)) ou ConA (en b)); 11= témoin cellulaire; 12= contrôles pour le PCR (positif et négatif en a), et négatifs seulement en b)).

a) TNF

b) IFN- γ 

Mesure de la proportion (%) de lymphocytes B dans une population de splénocytes en division (Fig.8).

Fraction	Concentration (ng/mL)	Durée d'incubation (h)			
		0	24	48	72
F1	2500	68,1	70,9	67,5	53,4
	5000	68,1	68,6	71,1	64
	10000	68,1	69,5	67,7	56,8
F2	2500	68,1	68,7	64,7	53,4
	5000	68,1	71,8	62,8	55,4
	10000	68,1	64,7	65,5	55,9
LPS	100	68,1	75,5	72,8	67,2
Contrôle cellulaire	-	68,1	66,1	61	56

Comparaison des sécrétions d'IL-6, d'IL-12 p40 et d'IFN- γ par des splénocytes de souris C57BL/6, BALB/c et *nude* stimulés avec F1 (Fig. 9, 10 et 13).

Souche de souris	Concentration de F1 (ng/mL)	Sécrétion de cytokines		
		IL-6	IL-12 p40	IFN- γ
C57BL/6	2500	0,233	1,4	0,236
	5000	0,33	1,29	0,601
	10000	0,466	1,32	0,834
BALB/c	2500	0,454	0,87	0,775
	5000	1,892	1,03	1,09
	10000	3,031	1,02	1,16
<i>nude</i>	2500	7,945	0	0,676
	5000	11,472	0	0,965
	10000	13,931	0	1,22
Contrôle positif	-	1 ^a	1 ^b	1 ^a

^a ConA (5000 ng/mL)

^b LPS (100 ng/mL)

Les résultats sont exprimés en proportion du témoin positif (ConA ou LPS), considéré comme "1".

7. Cinétique de production de l'IFN- γ par des splénocytes de souris C57Bl/6 stimulés avec F1 (Fig. 14).

Fraction	Concentration (ng/mL)	Durée d'incubation (h)			
		0	24	48	72
F1	2500	68,1	70,9	67,5	53,4
	5000	68,1	68,6	71,1	64
	10000	68,1	69,5	67,7	56,8
LPS	100	68,1	75,5	72,8	67,2
Contrôle cellulaire	-	68,1	66,1	61	56

Appendice H

Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in Human and Mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- γ in Mouse splenocytes.

(Le Lait, vol. 81, no. 6, sous presse)

Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in Human and Mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- γ in Mouse splenocytes.

Sylvie Chabot^a, Han-Ling Yu^b, Louis de Léséleuc^b, Denise Cloutier^b,
Marie-Rose Van Calsteren^c, Martin Lessard^d, Denis Roy^c, Monique Lacroix^a, Daniel
Oth^{b*}

^aMicrobiology and Biotechnology Research Centre, ^bHuman Health Research Centre
INRS-Armand-Frappier Institute, 531, des Prairies Blvd, Laval, QC, Canada, H7V 1B7

^cFood Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, 3600,
Casavant Blvd. West, Saint-Hyacinthe, QC, Canada, J2S 8E3; ^dDairy and Swine
Research and Development Centre, POB 90, Lennoxville, QC, Canada, J1M 1Z3.

*Correspondance and reprints: Phone : (450) 687-5010; Fax : (450) 686-5501
e.mail: Daniel.Oth@INRS-IAF.UQUEBEC.CA

Running title : EPS from *L. rhamnosus* stimulate cytokines.

Abstract

Exopolysaccharides (EPS) from *Lactobacillus rhamnosus* RW- 9595M have been prepared from bacterial cultures, isolated, concentrated, fractionated and tested in vitro for their possible modulating properties on mouse splenocytes from the C57BL/6 and BALB/c strains, on the murine RAW 264.7 macrophage-like cell line and on human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) from a total of 14 healthy donors. A first step of EPS fractionation was attempted, using membranes with different molecular weight cut-off. Fractions were as follows: F1: $>1000 \text{ kg.mol}^{-1}$; F2: $1000-100 \text{ kg.mol}^{-1}$; F3 : $100-10 \text{ kg.mol}^{-1}$; F4: $<10 \text{ kg.mol}^{-1}$. Total EPS, as well as F1, appeared slightly mitogenic in both mouse splenocytes and human PBMC in 2-3 d cultures, and F3 also exhibited such a property on human PBMC. Unfractionated concentrated (« total ») EPS, as well as F1, elicited TNF, IL-6 and IL-12 p40 both in the mouse and human cells, in 6 h and 24 h cultures, with important variability depending on the cell source. In 24h cultures, total EPS or F1 elicited bio-active IFN- γ in both C57BL/6 and BALB/c splenocytes, and this IFN- γ secretion was sustained until at least 3 d of culture. In human PBMC, no IFN- γ production was observed despite high IL-12p40 secretion. These results suggest the possibility of enhancing the immune system through EPS from lactic acid bacteria, in individuals responsive to such a stimulus.

***L.rhamnosus* / exopolysaccharide / mouse / human / cytokine / interferon gamma.**

Productions de TNF, IL-6, IL-12 et IFN- γ chez des cellules immunocompétentes traitées avec des exopolysaccharides de *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. Différence entre les réponses de cellules de sang périphérique humain et de splénocytes de souris.

Résumé

Les exopolysaccharides (EPS) du *Lactobacillus rhamnosus* RW- 9595M ont été préparés à partir de cultures bactériennes, isolés, concentrés, fractionnés et testés in vitro quant à leur potentiel immunomodulateur sur des splénocytes de souris C57BL/6 et BALB/c, sur la lignée macrophagique murine RAW.264.7 et sur des cellules mononuclées du sang humain provenant de 14 donneurs. Nous avons fractionné ces EPS en fonction des tailles moléculaires, avec des membranes filtrantes de différentes porosités. Les fractions correspondent aux tailles suivantes : F1: $>1000 \text{ kg.mol}^{-1}$, F2: $1000-100 \text{ kg.mol}^{-1}$, F3 : $100-10 \text{ kg.mol}^{-1}$ et F4 : $<100 \text{ kg.mol}^{-1}$. Les EPS concentrés, non fractionnés, ainsi que F1, se sont avérés légèrement mitogènes sur des splénocytes de la souris, ou des cellules sanguines humaines, cultivées 2-3 jours. Dans le dernier cas, F3 manifeste également cette propriété. Les EPS non fractionnés, ainsi que F1, sont capables de provoquer la production de TNF, IL-6, IL-12p40 après 6 ou 24 h de culture, l'origine des cellules étant importante pour l'intensité de la réponse. Après 24, 48 et 72 h de culture, les EPS non fractionnés, ainsi que F1, ont provoqué la production d'interféron gamma par des splénocytes de souris C57BL/6 et BALB/c. Au contraire, dans le cas des cellules sanguines humaines, aucune production d'interféron gamma n'a pu être observée, en dépit d'une bonne réponse en IL-12p40. Ces résultats suggèrent que les EPS de bactéries lactiques peuvent stimuler certaines fonctions immunitaires chez des sujets aptes à répondre.

***L.rhamnosus* / exopolysaccharide / souris / humain / cytokine / interferon gamma.**

Introduction

Genera *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Bifidobacterium* are often referred to as « Lactic Acid Bacteria » (LAB) or dairy-related microorganisms. LAB have been shown to contribute to the yogurt consumer's health by their capacity to stimulate the immune system, especially by eliciting or reinforcing production of cytokines such as TNF, IL-6, IL-12, IL-18 and IFN- γ [22, 27, 30, 31, 45] with possible implications in anticancer defence [49]. In addition, several gut bacteria-derived polysaccharides are also well known potent stimulators of the immune system, most of them being combined to residues of lipidic (lipopolysaccharides) or peptidic (peptidoglycans) nature [17]. Thus, stimulation of the immune system through food-added bacteria or bacterial products has been the focus of active research in the recent years [43]. In particular, stimulation of the specific « cellular » component of the immune system, the « Th1 response » which results in the resistance against most infectious agents and reduces the manifestations of allergy [26] has been particularly focused on. The « Th1 response » is characterized mostly by IFN- γ . Not surprisingly, IFN- γ production, as well as the production of IFN- γ -eliciting cytokines such as IL-12 and IL-18, have therefore been considered as an important criterion in the evaluation of the immunostimulating capabilities of LAB [22, 31, 43, 45]. Besides bacteria, lipopolysaccharides and peptidoglycan, it has been recently shown that « T cell dependent » responses can also be triggered by « simple » polysaccharides of bacterial origin, but it seems that such a property is unusual among them [21].

On the other hand, the dairy product industry considers the use of polysaccharides released by some lactic bacteria, the exopolysaccharides (EPS), for their capacity to bring about some rheological qualities to yogurt [10, 25, 48]. EPS produced by LAB have been recently reviewed [38] and some preliminary results suggest that some EPS might be used not only for their rheological properties but also for putative health-promoting properties, which would include anti-tumor and immunostimulatory actions. In the human, EPS originating from bacteria associated with some pathologies have been found to elicit some pro-inflammatory cytokines/chemokines [3].

In this work we studied the possibility, for EPS of *lactic* origin, to elicit cytokines, both of the “pro-inflammatory” and of the “T cell-dependent” kinds. EPS produced by a highly productive *Lactobacillus rhamnosus* strain, RW-9595M [12] have been tested. These EPS exhibited varying abilities to stimulate pro-inflammatory cytokines in mouse splenocytes as well as in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from several healthy human donors. Because the capacity of eliciting IFN- γ production seemed to us of particular interest, and knowing that such a production is genetically regulated, two different strains of mice (C57BL/6 and BALB/c), well known for their differential IFN- γ responses in some pathological situations [24] were comparatively tested for their cytokine responses. PBMC from several healthy human donors were also screened for their cytokine responses.

EPS-stimulated splenocytes from both murine strains were able to produce high IFN- γ responses, whereas PBMC from none of 14 human donors did so. However, under in vitro stimulation with EPS, these PBMC were able to elicit significant amounts of IL-12, a pro-inflammatory cytokine well known for its IFN- γ -inducing capacity. Thus, there seems to be a potential, in these EPS, to help a “Th1” type of immune response which would favor both anti-infection and anti-allergy reactions. Of course these reactions will have to be monitored in vivo, in further studies.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and culture conditions

The exopolysaccharide (EPS)-producing strain of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M was provided by Denis Roy from the Food Research and Development Centre (Agriculture Canada and Agri-Food Canada, St-Hyacinthe, Quebec, Canada). *L. rhamnosus* was subcultured in 20 mL of Lactobacilli MRS broth and incubated anaerobically for 48 h at 37 °C. Stock cultures were stored at –40 °C in BHI (Difco) broth in 15% (v/v) of glycerol.

2.2. EPS preparation and fractionation

L. rhamnosus RW-9595M was subcultured twice in MRS broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), at 37 °C for 18 h under anaerobic conditions. The bacteria were then inoculated 1% v/v in 1.5 litre fermenters (Biostat M, Braun, Melsungen, Germany), filled with Basal Minimum Medium as described in [16]. Growth occurred at 37 °C during 24 h with an agitation of 100 rpm. The pH was automatically adjusted to 6.0 with NH₄OH 7N. EPS were isolated according to Cerning [6]. The culture broth was heated at 100 °C for 15 min to inactivate glycohydrolases.

The culture broth was centrifuged at $17\,700 \times g$ for 30 min at 4 °C and the bacteria were discarded. The supernatant was mixed with 95% ethanol (1:3) and left overnight at 4 °C to precipitate the EPS. These were collected by centrifugation at $14\,300 \times g$ for 30 min at 4 °C, then dissolved in distilled water. The solution was dialysed against distilled water for 24 h at 4 °C, with periodical changing of water, then freeze-dried. EPS were isolated by three successive additions of 10% trichloroacetic acid (TCA) precipitations followed by centrifugation at $4620 \times g$ for 15 min at 4 °C. The EPS solution was dialysed against distilled water for 5 d, at 4 °C, with daily changing of water, then freeze-dried.

Protein content was measured according to Bradford [5] using the Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and no trace of proteins was detected. The isolated EPS preparation was freeze-dried. The molecular weight of EPS was determined

by size exclusion gel permeation chromatography (GPC) using a Varian Vista 5500 High-pressure liquid chromatography (HPLC) (Varian Inc., Sunnyvale, CA, USA) coupled with a Varian Auto Sampler, Model 9090, with a standard U.V. detector set at 210 nm. Two Supelco Progel TSK PWH (7.5 mm x 7.5 cm) and TSK GMPW (7.5 mm x 30 cm) guard columns (Supelco, Sigma Aldrich, Canada Ltd, Oakville, ON, Canada), followed by two Waters UltraHydrogel analytical columns (2 000 and 500, 7.5 mm x 30 cm; Waters Corporation, Mississauga, ON, Canada) were used for molecular weight determination. Chromatography was performed on 0.5% EPS, at the rate of 0.5 mL.min⁻¹, with an aqueous eluant (0.02 mol.L⁻¹ phosphate buffer, pH 7.0 containing 0.10 mol.L⁻¹ NaCl). A molecular weight calibration curve was established using a set of dextran and dextran-blue molecular weight markers ranging from 5 to 2000 kg.mol⁻¹ (Polymer Standard Service USA Inc., Silver Spring, MD, USA). The EPS were filtered on 0.45 µm nylon membrane filters (VWR Nalge, Mississauga, ON, Canada) prior to GPC analysis.

EPS preparation was dissolved in deionized water (1.15 mg.mL⁻¹) and fractionated by successive filtrations, under a pressure of 55-60 psi, using membranes of different molecular weight cut-off: 1000 kg.mol⁻¹ and 100 kg.mol⁻¹ (Omega, Pall Filtron, Calgary, AB, Canada) and 10 kg.mol⁻¹ (Diaflo, PM10, Amicon, Beverly, MA, USA). Four fractions were obtained: F1: >1000 kg.mol⁻¹; F2: 100-1000 kg.mol⁻¹; F3: 10-100 kg.mol⁻¹ and F4: <10 kg.mol⁻¹, and confirmed by size exclusion chromatography as described above. Each of these fractions was freeze-dried. A stock solution (500 ng.mL⁻¹) of each of these fractions was sterilised by filtration on 0.22 µm filters, aliquoted and kept at -20 °C.

2.3. Mice

Female C57BL/6 and BALB/c mice (Charles River Canada, St-Constant, QC, Canada) were used for the splenocyte stimulations. They were kept in our facilities in specific pathogen free (SPF), temperature-, humidity- and light cycle-controlled conditions. All animals were sacrificed by cervical dislocation at the age of 2-4 months.

2.4. Splenocytes culture

Splenocytes were aseptically prepared and suspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % Fetal Bovine Serum (FBS), HEPES, glutamine and gentamycin, and placed in 24-well plates (5×10^6 cells.mL⁻¹). Splenocytes were stimulated, in quadruplicate, with EPS preparations at different concentrations (2 500-10 000 ng.mL⁻¹) and their cytokine responses were assessed in either the culture supernatants or in the mRNA preparations. Positive controls consisted of stimulation with either LPS (100 ng.mL⁻¹, lot# 87114062, Sigma, St-Louis, MO,USA) or ConA (5 µg.mL⁻¹, Sigma). The plates were then incubated at 37 °C, under a 5% CO₂ atmosphere and saturated humidity, for either 6 h (TNF) or 24 h (IL-6, IL-12 and IFN-γ). In IFN-γ production kinetic studies, splenocytes were stimulated as above and incubated for 6, 24, 48 or 72 h. After incubation, cells were collected by centrifugation (520 x g, 7 min) and kept frozen at -80 °C for further RNA extraction. The supernatants were aliquoted and stored at -20 °C for cytokine determinations.

2.5. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)

PBMC were prepared from the blood of healthy donors as in [1]. In brief, mononuclear cells were isolated on a Ficoll-Paque gradient from heparinized blood. They were incubated at the concentration of 2×10^6 cells.mL⁻¹ and tested for their cytokine responses as for the mouse splenocytes.

2.6. RNA isolation

RNA from splenocytes or PBMC was extracted using the Trizol LS reagent (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) as lysing agent, followed by the use of the RNA-Tack Resin (Biotechx Laboratories Inc., Houston, TX, USA). RNA concentration in each sample was measured by spectrophotometry at 260 nm and the concentration was adjusted to 0.1 µg.mL⁻¹.

2.7. RT-PCR

RT reaction was performed on the RNA samples to obtain cDNA, using the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MuLV, USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA). These cDNA samples were submitted to PCR in order to determine the expression of the IFN- γ gene. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene, a “housekeeping gene”, was used as a reference. The primers were: mouse IFN- γ : 5'CAA GTG GCA TAG ATG TGG AA 3' / 5' CTG GAC CTG TGG GTT GTT 3' [7]; human IFN- γ : 5'GGT TCT CTT GGC TGT TAC TGC C/ 5'GTT GGA CAT TCA AGT CAG TTA CC 3' [34], and mouse or human GAPDH : 5' CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T 3' / 5' CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC 3' [9] . Samples were amplified for 35 cycles at 95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min and 72 °C for 1 min with a final extension at 72 °C for 7 min. The PCR products were separated on a 2% agarose gel and visualised with ethidium bromide.

2.8. Assessment of cell proliferation

Cell proliferation was measured, for total EPS and for EPS fractions at different concentrations, using the MTT colorimetric method [44]. Working in 96-well plates, 50 μ L of 5×10^6 cells (splenocytes or PMBC) /mL were put together with 50 μ L of EPS preparations and incubated for various periods of time. After incubation, 100 μ L of MTT (0.1 mg.mL⁻¹, Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville ON, Canada) were added and cells were incubated overnight at 37 °C. Supernatants were discarded, 100 μ L of dimethylformamide-sodium-dodecylsulfate were added to the cells, and the plates were incubated for another 5 h at 37 °C. Absorbances were measured at 570 nm on a plate reader (Easy Reader EAR 400 AT, SLT-LabInstruments, Grödig, Austria).

2.9. Cytofluorometry

Splenocytes were prepared as above and incubated with EPS preparations for either 24, 48 or 72 h. They were incubated with a fluorescein-conjugated goat affinity purified F(ab')₂ fragment to mouse IgG (Lot: 00974, ICN Pharmaceuticals, Inc., Aurora, OH,

ELISA kits were used, according to the manufacturer's instructions, for other cytokines determinations: human and mouse IL-12, p40 (R and D Systems, Minneapolis, MN, USA) with minimum detectable doses of 15 pg.mL^{-1} and 4 pg.mL^{-1} , respectively; human IFN- γ (R and D Systems or BioSource International, Camarillo, CA, USA), with a minimum detectable dose of 8 pg.mL^{-1} .

2.11. Statistical analysis

Variance analysis, Student's t and Mann-Whitney tests were used in paired-comparison with negative cell controls [41]. In the cell proliferation determinations, for each independent experiment, mean (from at least 8 wells) absorbance values were compared between the "control" and the LPS-, EPS- or F3-added groups. Taking the "control" group value as "100%", experimental groups values were expressed as a percentage of the control. Taking the standard-deviations of each group into account, groups were compared between each other by the Student's t test. For cytofluorometry measurements, splenocytes were stimulated in duplicate (the wells were pooled for the measurements) and 10 000 cells were counted for each experimental point. All mouse cytokine determinations were done on the basis of 5 independent splenocyte stimulations, and tests were performed in quadruplicate. For the IFN- γ production kinetics, 3 independent experiments were performed, and each of them represented a pool of 4 culture wells.

USA) diluted 1:150, which principally marks B lymphocytes. Samples were then washed with the “FACS medium” (PBS pH 7.4 enriched with FCS 1% and NaN₃ 0.5%) and suspended in 500 µL of the FACS medium containing 1% paraformaldehyde (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA). Cytofluorometry was performed on an EPICS XL-MCL cytofluorometer (Beckman Coulter, Hialeah, FL, USA). Splenocytes undergoing division were selected on the basis of their larger size (as determined by the forward scatter intensity), and the proportions of fluorescein-positive cells were then determined in this zone.

2.10. Cytokine determinations

Cytokine contents in the supernatants of splenocytes were determined from pooled quadruplicate cultivation wells, for each experimental point. Bioassays for TNF and for IL-6 were done as in [47]. In brief, for TNF, actinomycin D-treated L-929 cells were incubated for 16-20 h with supernatants dilutions and stained with cristal violet. One unit was defined as the reciprocal of the dilution giving 50% cytotoxicity. For IL-6, the IL-6-dependent B9 cell line was incubated with supernatant dilutions for 4 d, and B9 cell proliferation was assessed by MTT. Absorbance was read at 540 nm and one unit was defined as the amount inducing half-maximal absorbance. The IFN-γ bio-assays were done on the supernatants according to Migliorini *et al.* [32] in 96-well plates, using 100 µL/well of a 2×10^5 cells.mL⁻¹ suspension of RAW 264.7 cells (ATCC T1B71). After an incubation of 18-24 h, the supernatant was discarded. Fifty µL of both LPS (20 ng.mL⁻¹) and supernatants were added to the cells, before incubating them at 37 °C for 24 h. Fifty µL of the supernatants were put into a new 96-well culture plate, as well as the NaNO₂ dilutions used for tracing the standard response curve. Then, 100 µL of “Griess Reagent” (equal amount of the two following solutions: 0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride in H₂O and 1% sulphanilamide in 5% H₃PO₄) was added. Finally, absorbances were measured at 540 nm. At several occasions, we validated the technique by neutralising the IFN-γ activity in the bio-assay, using a rat anti mouse IFN-γ antibody (10 µg.mL⁻¹; Pharmingen, Mississauga, ON, Canada).

3. Results

3.1. Preliminary characterization of the EPS

The HPLC profile (Fig. 1) shows that the molecular mass of EPS of this preparation exhibits at least two principal peaks corresponding to approximately 200 kg.mol^{-1} and $2\,000 \text{ kg.mol}^{-1}$. Elemental analysis revealed the absence of nitrogen, and ipso facto of protein. The total EPS fraction appears of high purity and homogeneity by NMR spectroscopy. The sugar composition of the EPS produced by *L. rhamnosus* RW-9595M used in this work, as determined on the hydrolysate by HPLC and by gas chromatography of the alditol acetates, is the following : rhamnose, 4 ; glucose, 2 ; and galactose, 1 (M-R van Calsteren, manuscript in preparation).

3.2. Mitogenic properties of EPS

The growth response, assessed by the MTT method, of splenocytes from C57 Bl/6 mice cultured with the EPS fractions is shown on Tab. I. The responses can be clearly observed after an incubation time of 48 h. Considering the control (cells cultured alone) as 100%, the most significant results were obtained with F1 at the concentration of $5\,000 \text{ ng.mL}^{-1}$. This is close to what is obtained with LPS , a long known mitogen for mouse B cells [50]. As similar cell number increases were obtained in both F1-treated and LPS-treated samples, we postulated that these increases were possibly linked to B cell proliferation. Indeed, IgG-labelled cells (principally B cells) represent up to 71.1% of the large size cells (principally dividing cells) stimulated with F1 at $5\,000 \text{ ng.mL}^{-1}$. For all time points and all concentrations, treatment with F1 results in an overall effect situated between that of the positive (LPS) and negative controls. For the 48h time point and for the concentration of $5\,000 \text{ ng.mL}^{-1}$, F1 treatment gives a result very comparable to that obtained with LPS (Fig. 2). On the other hand, F2 and F3 were less efficient and F4 was inactive (not shown).

Mitogenic properties of F1, F2 and F3, in comparison with those of LPS [28], were tested also on human PBMC. They all exhibited some mitogenic properties, depending on the

donor (not shown). Table II exemplifies the comparable mitogenic capacities of F3 and LPS, on PBMC from 7 donors.

3.3. Proinflammatory responses to EPS

We found that total EPS and F1, but not F2 and F3 (not shown), were able to induce some mouse cells to secrete TNF after 6 h of culture, and this capacity depended on the origin. Splenocytes from C57BL/6 did not respond, whereas those from BALB/c responded mildly (from 18.5 to 19 units.mL⁻¹). In contrast the RAW 264.7 cells, which are cultured murine macrophage-like cells and were used as typical TNF secretors, responded strongly to EPS or F1 stimulation (838 to 2 228 units.mL⁻¹). On the other hand, after 24 h of culture, total EPS and F1 also elicited IL-6 secretion by splenocytes. Figure 3 shows that the response of C57BL/6 splenocytes to F1 is always statistically different from the unstimulated controls ($p \leq 0.01$, *t* test, for all F1 concentrations). One single experiment was also performed using BALB/c mice splenocytes. These mice responded apparently stronger than did the C57BL/6 (Fig. 3). The IL-12p40 responses to F1 were also tested in a single experiment (Fig. 3). In both strains IL-12 responses were modest, but the basal IL-12p40 activity in the supernatant was relatively high.

PBMC from up to 14 donors were cultured with total EPS for 6 h (TNF) or 24 h (IL-6, IL-12p40) and cytokine production was assessed. Compared to unstimulated PBMC, EPS- and LPS-activated PBMC secreted significant amounts of TNF- α ($p \leq 0.001$, Mann-Whitney test). PBMC from all donors exhibited IL-6 responses to both EPS and LPS. As for the IL-12p40 production, all of the 7 donors tested responded to total EPS, with one donor (BF) not responding to LPS. The difference between controls and EPS-treated groups is always statistically significant ($p \leq 0.001$, Mann-Whitney test). Table III shows the results obtained with the 7 donors who were all tested for these three cytokines.

3.4. IFN- γ responses to EPS

After a 24 h culture, significant ($p \leq 0.01$, Mann-Whitney test) IFN- γ production was observed with C57BL/6 splenocytes in response to different concentrations of F1. In a

single experiment, BALBC/c splenocytes responded in a similar fashion to this stimulus (Fig. 3). In addition to the bioassay validations described in “Material and methods”, IFN- γ response specificity was also checked by RT-PCR. Both F1 and total EPS were able to stimulate the IFN- γ gene expression, as well as did ConA (Fig. 4a). A kinetics study showed that IFN- γ production did not occur before 6 h, and even 18 h in culture in the case of the lower F1 concentration, and reached a plateau between 48 and 72 h, regardless of the F1 concentration (Fig. 5). With the human PBMC, none of the 14 donors tested exhibited any convincing IFN- γ response to either total EPS or F1, at the concentrations which were effective in the case of the mouse splenocytes (not shown). Also, human IFN- γ gene expression was not modified by EPS, under similar conditions (Fig. 4b).

4. Discussion

Polysaccharides from various sources have long been known to be adjuvant or stimulators of the immune system. Most polysaccharides are complex and appear as combined to various lipidic, peptidic or polar groups. However « pure » polysaccharides, as the EPS we prepared from *L. rhamnosus* RW-9595M appear to be, have also been reported to exert immunomodulating activities including IFN- γ stimulation [14, 20]. Some immunomodulating properties of polysaccharides have been found to depend on stereochemistry [33], molecular size [21] or number of sugar residues implicated [19].

In the present report, it appears that F1, which corresponds to EPS of the highest molecular weights ($>1000 \text{ kg.mol}^{-1}$), can stimulate cytokine production, whereas fractions corresponding to lower molecular size seem less capable of doing so, at least in the mouse. However, further EPS preparations, and more discriminate separations based on the molecular weight, are certainly necessary to establish a clear relationship between molecular weight and immunomodulating capacity, both in the mouse and in the human.

Polysaccharides are well known mitogens for a variety of cells. For instance LPS is a B lymphocyte mitogen in the mouse [50] and, in the presence of monocytes, a T lymphocyte mitogen in the human [28]. EPS from *L.rhamnosus* also exhibited mitogenic properties on mouse (Tab. I), human (Tab. II) swine and bovine cells (Lessard, unpublished). EPS from *Halomonas Eurihalina* were recently reported to influence the non-specific proliferation of human PBMC [36]. In the present work EPS were also found to stimulate proinflammatory cytokines in mouse and human, in a fashion comparable to LPS.

The present study therefore seems to suggest some shared properties between LPS and EPS from *L.rhamnosus* RW-9595M, which appear as slightly mitogenic and able to stimulate the production of pro-inflammatory cytokines. However, in the case of EPS, we observe a striking difference between the responses of mouse splenocytes on the one hand, and human PBMC on the other hand, in the IFN- γ response. Preliminary studies

suggest that PMBC from swine cannot be elicited by EPS preparations to secrete IFN- γ , either. However, both swine and bovine PBMC exhibited a dose-dependent PGE₂ response to stimulation with EPS (Lessard, unpublished). Presently we do not know whether such a difference stems from the *species*, or from the *tissue* origin, of the cells stimulated with the EPS. The absence of IFN- γ response of the human PBMC, as compared to the murine splenocyte response, could result from a lack of co-signal or co-factor. IL-12, however, does not seem to be a good candidate for such a critical role of co-signal, because a clear IL-12 response to EPS stimulation was actually found in the human (Tab. III), in contrast to a less pronounced response in the mouse, where a relatively high IL-12p40 concentration was observed even in the absence of EPS stimulation (Fig. 3). However, in the present work, IL-12 response was assessed by the IL-12p40 secretion, which certainly indicates a response but does not necessarily mean that the response consists in functional IL-12. Bioactive IL-12 is in a hetero-dimeric form (IL-12p70) and an excess of IL-12p40 may be inhibitory. Therefore, the IL-12 response observed here must be taken cautiously, as for its biological signification. But since IL-12 is a key actor in the production of IFN- γ as well as in other important functions [40] we consider that the IL-12 response of human PBMC to EPS reflects an encouraging response capacity of the human to the immunostimulating capacity of EPS. However, additional factors, such as IL-2 [4] or IL-18 [11] for instance, should also be considered in future investigations, to try to explain the difference in IFN- γ responses between the two systems.

These immunomodulating polysaccharides exert their action through cell membrane receptors whose nature, density and cellular distribution contribute to the response, but presently we can only speculate on the nature of the receptor(s) incriminated in the findings reported here. Microbial products can be recognised by several kinds of macrophage receptors, including the 'mannose receptor' (MR) [13, 23]. Rhamnose is 6-deoxy-L-mannose and the EPS of *L.rhamnosus* are rich in rhamnose. We thus consider that a MR family receptor might be involved in the immunostimulatory action of EPS, including presentation to T lymphocyte [37] with possible subsequent IFN- γ production. In addition, rhamnose-containing polysaccharides, such as rhamnose glucose polymers,

are ligands for both CD14 and CD11b cell receptors. 'CR3' (CD11b/CD18), a receptor expressed on phagocytes, NK cells and some cytotoxic T cells, could play a role since it has been reported to recognize also mannose-containing zymosan in soluble form [46] which corresponds to the presentation form of the EPS studied in this report. However, in the case of rhamnose/glucose polymer mediated TNF production, it seems that CD14 only, and not CD11b, plays a functional role [42]. A recent report also suggests some involvement of 'CR4' (CD11c/CD18) in the cytokine response [8]. Galectins, a large family of animal lectins [2] are also able to bind to oligomannosides [15]. In the case of CD14 ligands of glycolipidic nature, it seems that the « Toll Like Receptor » (TLR) family [39] could possibly deserve consideration in trying to explain some of our observations : it has been recently shown that different TLR family members possess different cell signalling capabilities, in the presence of ligands of different natures [29]. However, recent findings suggest that TLR signalling is very complex and that some responses are in fact due to lipoprotein contaminants present in commercial preparations of the glycolipids, rather than to the glycolipid itself [18]. In any case, the exact nature of the receptor(s) incriminated in the presently reported activity, as well as their density and cellular distribution, is totally unknown.

But the ultimate question, as to the human response to EPS, is of course the response of the gut associated lymphoid system, in vivo, for which the present work gives no answer. From the present results, we can however speculate that yogurt-associated EPS are potential actors in the health improvement observed among yogurt-consuming people. From a more practical view point, these preliminary results could be useful in the choice of LAB to use as a supplement to a « probiotic » yogurt. We have compared some immunomodulating properties of intact, irradiation-inactivated, bacterial preparations from the EPS-producing *L.rhamnosus* RW-9595M strain and of its closely related, non-producing counterpart *L.rhamnosus* ATCC-9595 strain. Bacteria were used at several concentrations. It appears that both strains are equally able to elicit IFN- γ , in experimental conditions similar to those described in this article. However, in the case of the ability to secrete the pro-inflammatory cytokine TNF, the EPS-producing RW-9595M strain exhibits a comparatively much less ability than the non-EPS-producing strain

(Chabot, unpublished). Since TNF is often associated with gut inflammation [35], which is also associated with an excessive IgE production driven by Th2-type lymphokines, it seems therefore to us more appropriate to select the EPS-producing strain RW-9595M, rather than the original ATCC-9595, as an additive to yogurt, for the consumer's well-being.

Acknowledgements

This work was funded by CORPAQ (Ministry of Agriculture, Quebec, Canada). SC was supported by a “Fondation Armand-Frappier” fellowship, and LdL by a “Fonds pour la Formation de Chercheur et Actions Concertées” fellowship. We wish to thank J.Green-Johnson (Acadia University, Wolfville, N.S., Canada) for critically reading the manuscript, P.Duplay for generously giving the fluorescein-conjugated antibody, B. Watters for advice in EPS production and extraction, M.Desrosiers for performing the cytofluorometry experiment, and M.Desy for the statistical analyses.

6. References

- [1] Arbour N., Tremblay P., Oth D., N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces and modulates IL-1 and IL-6 in human PBMC, *Cytokine* 8 (1996) 468-475.
- [2] Barondes S.H., Cooper D.N., Gitt M.A., Lefler H., Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 20807-20810.
- [3] Bedard M., McLure C.D., Schiller N.L., Francoeur C., Cantin A., Denis M., Release of interleukin-8, interleukin-6 and colony-stimulating factors by upper airway epithelial cells : implications for cystic fibrosis, *Am. J. Respir. Cell Mol.Biol.* 9 (1993) 455-462.
- [4] Blanchard D.K., Djeu J.Y., Klein T.W., Friedman H., Steward W.E., Interferon-gamma induction by lipopolysaccharide : dependence on interleukin 2 and macrophages, *J. Immunol.* 136 (1986) 963-970.
- [5] Bradford M.A., Rapid method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [6] Cerning J., Renard C.M.G.C., Thibault J.F., Bouillanne C., Landon M., Desmazeaud M., Topisirovic L., Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 3914-3919.
- [7] Colle J.H., Falanga P.B., Singer B., Hevin B., Milon G., Quantification of messenger RNA by competitive RT-PCR : a simplified read out assay, *J. Immunol. Methods*, 210 (1997) 175-184.
- [8] Cuzzola M., Mancuso G., Beninati C., Biondo C., Genovese F., Tomasello F., Flo T.H., Espevik T., Teti G., β -Integrins are involved in cytokine responses to whole Gram-positive bacteria, *J. Immunol.* 164 (2000) 5871-5876.

- [9] Daher A., Varin M., Lamontagne Y., Oth D., Effect of preconceptional external or internal irradiation of N5 male mice and the risk of leukemia in their offspring, *Carcinogenesis* 19 (1998) 1553-1555.
- [10] de Vuist L., Degeest B., Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria, *Fed. Eur. Microbiol. Soc. Microbiol. Rev.* 23 (1999) 153-177.
- [11] Dinarello C.A., Novick D., Puren A.J., Fantuzzi G., Shapiro L., Mühl H., Yoon D-Y., Reznikov L.L., Kim S-H., Rubinstein M., Overview of interleukin-18 : more than an interferon- γ inducing factor, *J. Leukocyte Biol.* 63 (1998) 658-664.
- [12] Dupont I., Roy D., Lapointe G., Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24 (2000) 251-255.
- [13] Ernst J.D., Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*, *Infect. Immunity* 66 (1998) 1277-1281.
- [14] Estrada A., Yun C-H., Van Kessel A., Li B., Hauta S., Laarfled B., Immunomodulatory activities of oat β -glucan in vitro and in vivo, *Microbiol. Immunol.* 41 (1997) 991-998.
- [15] Fradin C., Poulain D., Jouault T., β -1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3, *Infect. Immunity* 68 (2000) 4391-4398.
- [16] Gamar L., Blondeau K., Simonet J-M., Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83, *J. Appl. Microbiol.* 83 (1997) 281-287.

- [17] Hamann L., El-Samalouit V., Ulmer A.J., Flad H-D., Rietschel E.Th., Components of gut bacteria as immunomodulators, *Int. J. Food. Microbiol.* 41 (1998) 141-154.
- [18] Hirschsfeld M., Ma Y., Weis J.H., Vogel S.N., Weis J.J., Cutting edge : repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine Toll-like receptor, *J. Immunol.* 165 (2000) 618-622.
- [19] Jouault T., Lepage A., Bernigaud P.A., Trinel C., Fradin J.M., Wieruszeski G., Strecker,G., Poulain,D., Beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* act as signals for tumor necrosis factor alpha production, *Infect. Immunity* 63 (1995) 2378-2381.
- [20] Kakumo S., Ishikawa T., Wakita T., Yoshioka K., Ito Y., Shinagawa T., 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 (1991) 969-975.
- [21] Kalka-Moll W.M., Tzianabos A.O., Wang Y., Carey V.J., Finberg R.W., Onderdonk A.B., Kasper D.L., Effect of molecular size on the ability of zwitterionic polysaccharides to stimulate cellular immunity, *J. Immunol.* 164 (2000)719-724.
- [22] Kato I., Tanaka K., Yokokura T., Lactic acid bacterium potently induces the production of interleukin-12 and interferon- γ by mouse splenocytes, *Int. J. Immunopharmacol.* 21 (1999) 121-131.
- [23] Keisari Y., Kabha K., Schlepper-Schafer J., Ofek I., Phagocyte-bacteria interactions, *Adv. Dent. Res.* 11 (1997) 43-49.
- [24] Kelso A., Troutt A.B., Maraskovsky E., Gough N.M., Morris L., Pech M.H. Thomson J.A., Heterogeneity in lymphokine profiles of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and clones activated in vivo and in vitro, *Immunol. Rev.* 123 (1991) 85-114.

- [25] Kleerebezem M., Van Kranenburg R., Tuinier R., Boels I.C., Zoon P., Looijesteijn E., Hugenholtz J., De Vos W.M., Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus lactis* : from engineering to improved rheological properties? *Antonie Leeuwenhoek* 76 (1999) 357-365.
- [26] Knopf P.M., Immunomodulation and allergy, *Allergy Asthma Proc.* 21 (2000) 215-220.
- [27] Marin M.L., Tejada-Simon M.V., Lee J.H., Murtha J., Ustunol Z., Pestka J., Stimulation of cytokine production in clonal macrophage and T-cell models by *Streptococcus thermophilus* : comparison with *Bifidobacterium* sp. and *Lactobacillus bulgaricus*, *J. Food Prot.* 61(1998) 859-864.
- [28] Mattern T., Thanhäuser A., Reiling N., Toellner K-M., Ducrow M., Kusumoto S., Rietschel E.Th., Ernst M., Brade H., Flad H-D., Ulmer A.J.W., Endotoxin and Lipid A stimulate proliferation of human T cells in the presence of autologous monocytes, *J. Immunol.* 153 (1994) 2996-3004.
- [29] Means T.K., Lien E., Yoshimura A., Wang S., Golenbock D.T., Fenton M.J., The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for toll-like receptors, *J. Immunol.* 163 (1999) 6748-6755.
- [30] Miettinen M., Vuopio-Varkila J., Varkila K., Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria, *Infect. Immunity* 64 (1996) 5403-5405.
- [31] Miettinen M., Matikainen S., Vuopio-Varkila J., Pirhonen J., Varkila K., Kurimoto M., Julkunen I., Lactobacilli and Streptococci influence interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells, *Infect. Immunity* 66 (1998) 6058-6062.

- [32] Migliorini P., Corradin G., Corradin SB., Macrophage NO₂- production is a sensitive and rapid assay for the quantitation of murine IFN-gamma, J. Immunol. Methods 17 (1991)107-114.
- [33] Ohno N., Hashimoto T., Adachi Y., Yadomae T., Corrigendum to : “Conformation of nitric oxide synthesis of murine peritoneal macrophages by β -glucans in vitro”, Immunol. Lett. 53 (1996) 157-163.
- [34] Pages F., Berger A., Henglein B., Piqueras B., Danel C., Zinzindohoue F., Thiounn N., Cugnenc P.H., Fridman W.H., Modulation of interleukin-18 expression in human colon carcinoma; consequences for tumor immune surveillance, Int. J. Cancer 84 (1999) 326-330.
- [35] Papadakis K.A., Targan S.R., Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, Annu. Rev. Med. 51 (2000) 289-298.
- [36] Pérez-Ferdandez M.E., Quesada E., Gálvez J., Ruiz C., Effect of exopolysaccharide V2-7, isolated from *halomonas eurihalina*, on the proliferation *in vitro* of human peripheral blood lymphocytes, Immunopharmacol. Immunotoxicol. 22 (2000) 131-141.
- [37] Prigozy T.I., Sieling P.A., Clemens D., Steward P.L., Behar S.M., Porcelli S.A., Brenner M.B., Modlin R.L., Kronenberg M., The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules, Immunity 6 (1997)187-197.
- [38] Ricciardi A., Clementi F., Exopolysaccharides from lactic acid bacteria : structure, production and technological applications, Ital. J. Food Sci. 12 (2000) 23-45.
- [39] Schuster J.M., Nelson P.S., Toll receptors : an expanding role in our understanding of human disease, J. Leukocyte Biol. 67 (2000) 767-773.

- [40] Sinigaglia F., D'Ambrosio D., Panina-Bordignon P., Rogge L., Regulation of the IL-12/IL-12R axis : a critical step in T-helper cell differentiation and effector function, *Immunol. Rev.* 170 (1999) 65-72.
- [41] Snedecor G.W., Cochran W.G., Statistical Methods, Iowa State University Press, Ames, IA, ,USA, 1978.
- [42] Soell M., Lett E., Holveck F., Schöller M., Wachsmann D., Klein J-P., Activation of human monocytes by streptococcal rhamnose glucose polymers is mediated by CD14 antigen, and mannan binding protein inhibits TNF- α release, *J. Immunol.* 154 (1995) 851-860.
- [43] Solis-Pereyra B., Aattouri N., Lemonnier D., Role of food in the stimulation of cytokine production, *Am. J. Clin. Nutr.* 66 (1997) 521S-525S.
- [44] Symons J.A., Dickens E.M., Di Giovine F., Duff G., Measurement of interleukin-1 activity, in: Clemens M.J., Morris A.G., Gearing J.H.(Eds), *Lymphokines and Interferons, a Practical Approach*, IRL Press, Oxford, U.K. 1987, pp 269-289.
- [45] Tejada-Simon M.V., Ustunol Z., Pestka J., Ex vivo effects of Lactobacilli, Streptococci, and Bifidobacteria ingestion on cytokine and nitric oxide production in a murine model, *J. Food Prot.* 62 (1999)162-169.
- [46] Thornton B.P., Vetvicka V., Pitman M., Goldman R.C. Ross G.D., Analysis of the sugar specificity and molecular location of the β -glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/Cd18), *J. Immunol.* 156 (1996) 1235-1246.
- [47] Tremblay P., Houde M., Arbour N., Rochefort D., Masure S., Mandeville R., Opdenakker G., Oth D., Differential effects of PKC inhibitors on gelatinase B and interleukin 6 production in the mouse macrophage, *Cytokine* 7 (1995) 130-136.

- [48] van Kranenburg R., Boels I.C., Kleerebezem M., De Vos W.M., Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides, *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 (1999) 498-504.
- [49] Yasutake N., Matsuzaki T., Kimura K., Hashimoto S., Yokokura T., Yoshikai Y., The role of tumor necrosis factor (TNF)- α in the antitumor effect of intrapleural injection of *Lactobacillus casei* strain Shirota in mice, *Med. Microbiol. Immunol.* 188 (1999) 9-14.
- [50] Zubler R.H., Werber-Favre C., Wen L., Sekita K-I., Straub C., Theoretical and practical aspects of B-cell activation: murine and human systems, *Immunol. Rev.* 99 (1987) 281-299.

Table I: Cellular growth of splenocytes from C57BL/6 mice stimulated with each EPS fraction, as determined by the MTT method.

Fraction designation (kg.mol ⁻¹)	Concentration (ng.mL ⁻¹)	Mean cellular growth (%) ^a
F1 (>1 000)	5000	130.8***
	10000	121.5**
F2 (100-1000)	5000	121.6*
	10000	125.9*
F3 (10-100)	5000	112.6*
	10000	114.3*
F4 (<10)	5000	96.2
LPS	100	132.7***

^aTime in culture : 48 h.

Comparison with control by the *t* test : * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$.

All values are expressed considering cell control as 100% (n= 6-8 for each experiment).

For 5 000 ng.mL⁻¹ : 3 independent experiments combined; for other concentrations: 2 independent experiments combined.

Table II : Cellular growth of human PBMC stimulated with F3, as determined by the MTT method.

Time in culture (h)	Donor designation	LPS 500ng.mL ⁻¹ (%)	F3 3000ng.mL ⁻¹ (%)
36	AE	109	110
	AF	122**	120*
48	AA	96 ^a	155 ^{b,*}
	AG	119**	111*
	AH	97	107
	AJ	130*	123
	AK	115**	108
60	AE	115	117
	AF	217***	150***
	AH	113	111
	AJ	123	118
	AK	98	125***

Comparison with control by the *t* test : * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$.

All values are expressed considering the cell control as 100% (n= 8 for all experiments).

^aLPS:100 ng.mL⁻¹ instead of 500 ng.mL⁻¹

^bF3: 2 000 ng.mL⁻¹ instead of 3000 ng.mL⁻¹

Table III : TNF, IL-6 and IL-12 productions in the supernatants of PBMC from 7 donors, after 6 h (TNF) or 24 h (IL-6, IL-12) of culture with medium alone (MA), or with EPS or LPS-added medium. Determinations were made with bio-assays (TNF and IL-6) or

ELISA (IL-12).

Donor#	TNF ^a			IL-6 ^a			IL-12 ^b		
	MA	EPS ^c	LPS ^d	MA	EPS ^c	LPS ^d	MA	EPS ^c	LPS ^d
BA	0	99	799	0	2 448	6 422	0	233	1 085
BC	0	360	810	0	11 600	449	0	93	521
BF	0	73	24	40	9 554	7 043	0	93	0
BJ	0	59	0	0	3 080	9 554	0	153	98 ^e
AA	0	184	338	55	3 420	2 065	0	530	341
AC	0	197	311	64	2 372	3 218	0	923	429
AE	0	62	256	389	81 920	62 950	0	981	Not done

^a In arbitrary units.mL⁻¹.

^b In pg.mL⁻¹.

^c 10 000 pg.mL⁻¹.

^d 100 ng.mL⁻¹.

^e Stimulated with 5 µg.mL⁻¹ of Con A instead of LPS.

Figure legends

Fig 1: HPLC profile of isolated concentrated EPS.

Starting from this initial preparation, fractions were eventually obtained by membrane filtration, as indicated by the dotted lines: F1, F2, F3 and F4 refer to the fractions mentioned in text.

Fig 2: Percentage of IgG positive cells, as determined by flow cytofluorometry, in a population of large size C57BL/6 splenocytes, in the presence of medium alone, of LPS or of F1 at different concentrations.

(◆) medium alone, (*) LPS 100 ng.mL⁻¹, (■) F1 2 500 ng.mL⁻¹, (▲) F1 5 000 ng.mL⁻¹, (●) F1 10 000 ng.mL⁻¹.

Fig 3 : Cytokines present in the supernatants of 24 h cultured splenocytes, as a function of the F1 concentration.

(●/○) IL-6 bioassay, (▲/△) IL-12p40 ELISA, (■/□) IFN-γ bioassay.

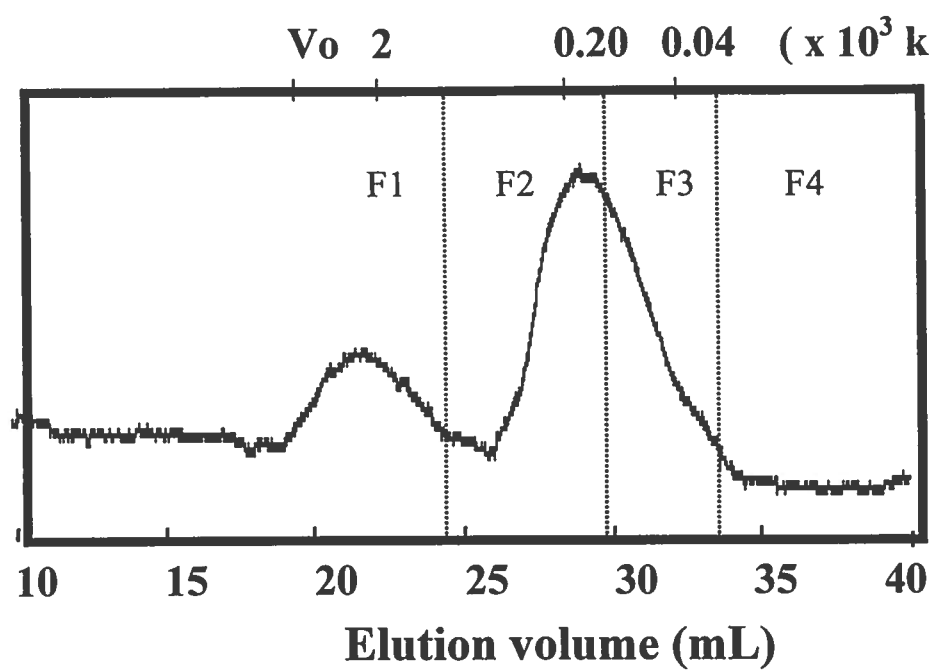
The results are expressed as “-fold”, where “1-fold” is the numerical value given by the positive controls (LPS for IL-6 and IL-12p40, Con A for IFN-γ). In the different experiments, “1-fold” represents 111.9-115.1 units.mL⁻¹ in the case of IL-6, 76.6-121 pg.mL⁻¹ in the case of IL-12p40, and 10.3-10.4 mmol.L⁻¹ of NO in the case of IFN-γ. Splenocytes were from either BALB/c (open symbols) or C57BL/6 mice (black symbols). Bar = standard deviation.

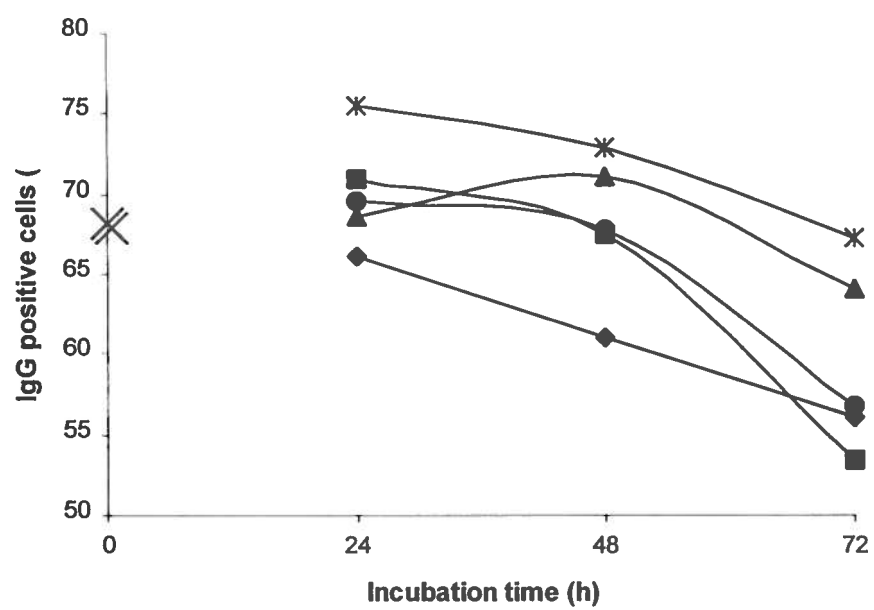
Fig 4 : IFN-γ gene expression from : a) C57BL/6 mouse splenocytes stimulated with different F1 concentrations (lane 1: 2 500 ng.mL⁻¹; lane 2 : 5 000 ng.mL⁻¹; lane 3: 10 000 ng.mL⁻¹) or total EPS concentrations (lane 4 : 2 500 ng.mL⁻¹; lane 5: 5 000 ng.mL⁻¹; lane 6 : 10 000 ng.mL⁻¹). Lane 7, no stimulation (negative control). Lane 8, stimulation with ConA, 5μg.mL⁻¹ (positive control). b) Human PBMC stimulated with : lane 3: total EPS, 10 000 ng.mL⁻¹; lane 4 : ConA, 5 μg.mL⁻¹ (positive control). Lane 2: no stimulation (negative control). Amplification of the GAPDH reference gene is shown in lane 1.

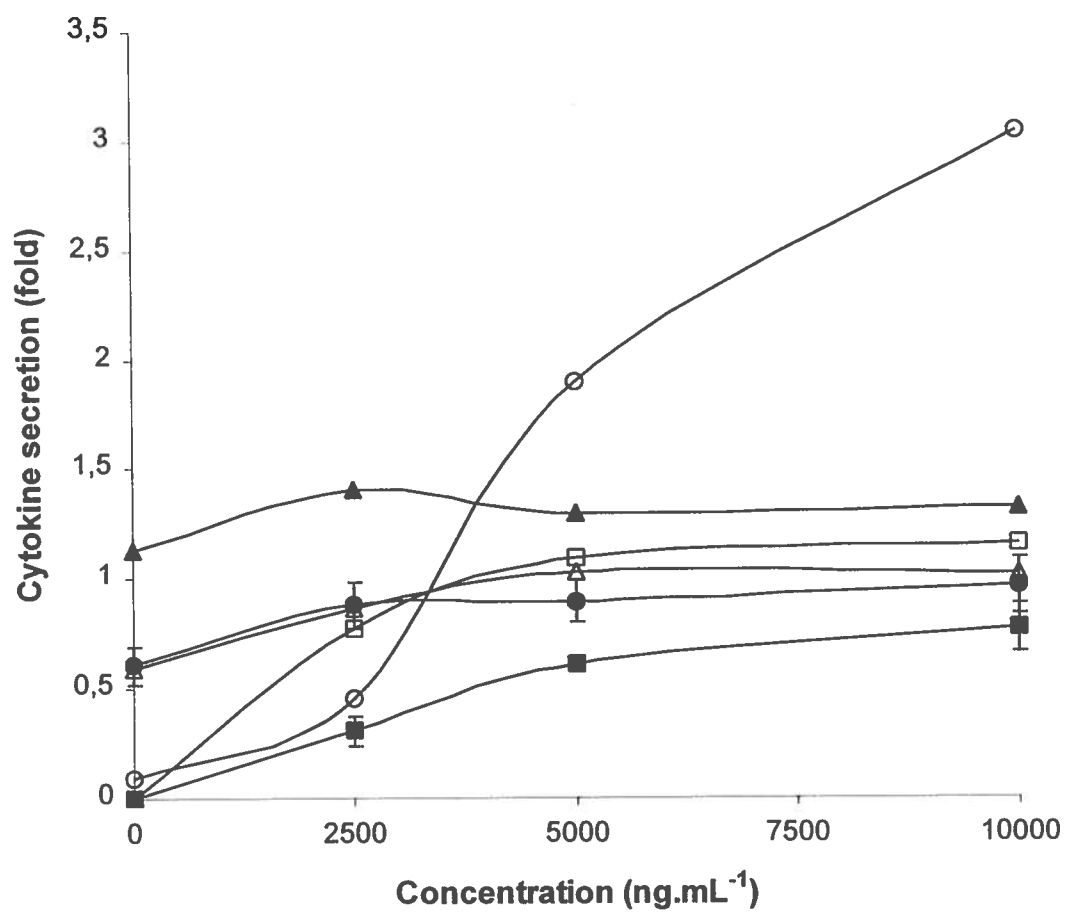
Fig 5 : IFN- γ secretion kinetics by C57BL/6 splenocytes stimulated with 3 different concentrations of F1, as a function of time in culture.

($\blacklozenge$) 2 500 ng.mL⁻¹, ($\blacksquare$) 5 000 ng.mL⁻¹, ($\blacktriangle$) 10 000 ng.mL⁻¹.

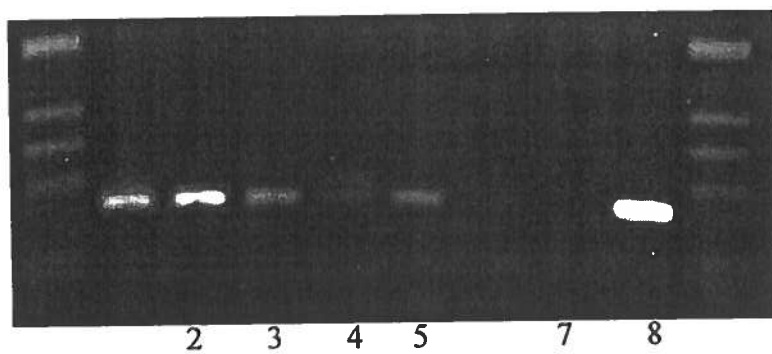
Three independent experiences were performed. Values are expressed as “-fold” taking the ConA positive controls as “1-fold”. “ One fold” values were comprised between 13.6 mmol.L⁻¹ and 57.2 mmol.L⁻¹ of NO, based on a bioassay. Bar = standard deviation.



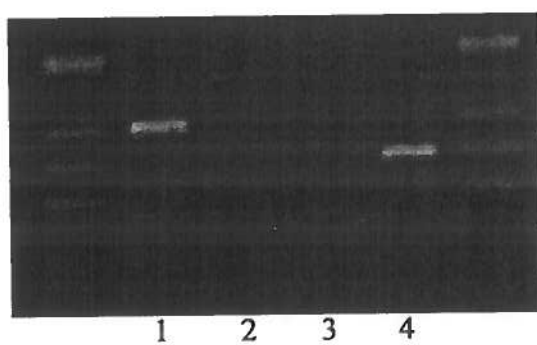


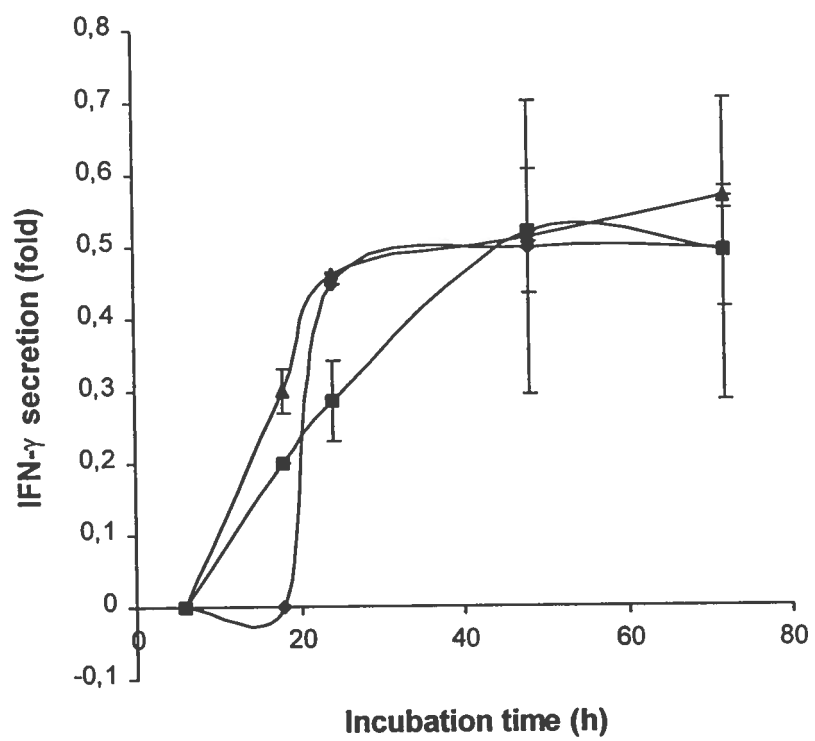


a)



b)





Liste des références

- ABBAD ANDALOUSSI, S., H. Talbaoui, R. Marczak et R. Bonaly. 1995. «Isolation and characterisation of exocellular polysaccharides produced by *Bifidobacterium longum*». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 43, p. 995-1000.
- ACHOUAK, W., R. Christen, M. Barakat, M.-H. Martel et T. Heulin. 1999. «*Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique». Int. J. Syst. Bact., vol. 49, p. 787-794.
- AGÜERO, G., S. Sanchez, S. Fernandez, C. Allori, A.P. De Ruiz Holgado et G. Perdigon. 1996. «Administration of yoghurt or *Lactobacillus casei* to malnourished mice: comparative effect on lymphoid cells and mucosal reconditioning of the intestine». Food Agric. Imm., vol. 8, p. 229-238.
- ALANDER, M., R. Korpela, M. Saxelin, T. Vilpponen-Salmela, T. Mattila-Sandholm et A. von Wright. 1997. «Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies». Lett. Appl. Microbiol., vol. 24, p. 361-364.
- ALLISON, D.G. et I.W Sutherland. 1987. «The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria». J. Gen. Microbiol., vol. 133, p. 1319-1327.
- ANTOINE, J.-M. 1997. «Rôle, en matière de santé, des produits laitiers fermentés utilisés en alimentation humaine». Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France, vol. 83, p. 81-86.
- BAKALINSKY, A.T., S.R. Nadathur, J.R. Carney et S.J. Gould. 1996. «Antimutagenicity of yogurt». Mutation Research, vol. 350, p. 199-200.
- BALTIMORE, R.S. et M. Mitchell. 1980. «Immunologic investigation of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of susceptibility to opsonic antibody in mucoid and nonmucoid strains». J. Infect. Dis., vol. 141, no. 2, p. 238-247.
- BANCHEREAU, J. 1993. «Interleukine-4». Chap. In Cavaillon, J.-M. Les cytokines, Paris, Masson éditeur, p. 237-247.
- BESHKOVA, D.M., E.D. Simova, G.I. Frengova, Z.I. Simov et E.F. Adilov. 1998. «Production of amino acids by yogurt bacteria». Biotechnol. Prog., vol. 14, no. 6, p. 963-965.
- BRADLEY, L.M., D.K. Dalton et M. Croft. 1996. «A direct role for IFN- γ in regulation of Th1 cell development». J. Immunol., vol. 157, p. 1350-1358.

- BRUCE, A.W., G. Reid, J.A. McGroarty, M. Taylor et C. Preston. 1992. «Preliminary study on the prevention of recurrent urinary tract infections in ten adults women using intravaginal lactobacilli». Int. Urogynecol. J., vol. 3, p. 22-25.
- CAVAILLON, J.-M. 1993. «Tumor necrosis factor». Chap. In Cavaillon, J.-M. Les cytokines, Paris, Masson éditeur, p. 167-181.
- CERNING, J. 1990. «Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria». FEMS Microbiol. Rev., vol. 87, p. 113-130.
- CERNING, J. 1994. «Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques». Chap. In Bactéries lactiques. Vol. 1. De Roissart, H. et Luquet, F.M., éditeurs. Uriage: éditions Lorica, p.309-329.
- CERNING, J., C. Bouillanne, M. Landon et M.J. Desmazeaud. 1992. «Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria». J. Dairy Sci., vol. 75, p. 692-699.
- CERNING, J., C.M.G.C. Renard, J.F. Thibault, C. Bouillanne, M. Landon, M.J. Desmazeaud et L. Topisirovic. 1994. «Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer». Appl. Env. Microbiol., vol. 60, p. 3914-3919.
- CHAMPAGNE, C.P., F. Girard et N. Morin. 1990. «Inhibition of psychrotrophic bacteria of raw milk by addition of lactic acid bacteria». J. Food Protect., vol. 53, p. 400-403.
- CHARLEY, B et C. LaBonnardiére. 1993. «Interféron gamma». Chap. In Cavaillon, J.-M. Les cytokines, Paris, Masson éditeur, p.131-143.
- CHARTERIS, W.P., P.M. Kelly, L. Morelli et J.K. Collins. 1997. «Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations». Int. J. Food Microbiol., vol. 35, p. 1-27.
- CLEVELAND, M.G., J.D. Gorham, T.L. Murphy, E. Tuomanen et K.M. Murphy. 1996. «Lipoteichoic acid preparations of Gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway». Inf. Imm., vol. 64, p. 1906-1912.
- COLLE, J.H., P.B. Falarga, M. Singer, B. Hevin et G. Milon. 1997. «Quantitation of messenger RNA by competitive RT-PCR : a simplified read out assay». J. Immunol. Methods, vol. 210, p. 175-184.
- CONWAY, P.L., S.L. Gorbach et B.R. Goldin. 1986. «Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells». J. Dairy Sci., vol. 70, p. 1-12.
- CSEH, K. et B. Beutler. 1989. «Alternative cleavage of the cachectin/tumor necrosis factor propeptide results in a larger, inactive form of secreted protein». J. Biol. Chem., vol. 264, p. 16256-16260.

- DAHER, A., M. Varin, Y. Lamontagne et D. Oth. 1998. «Effect of pre-conceptional external or internal irradiation of N5 male mice and the risk of leukemia in their offspring». Carcinogenesis, vol. 19, p. 1553-1558.
- DANIELS, B.F., M.C. Nakamura, S.D. Rosen, W.M. Yokoyama et W.E. Seaman. 1994. «Ly-49A, a receptor for H-2D^d, has a functional carbohydrate recognition domain». Immunity, vol. 1, p. 785-792.
- DAWSON, M.M. 1991. Lymphokines and interleukins. Boca Raton : CRC Press Inc, 239 p.
- DE MAN, J.C., M. Rogosa et M.E. Sharpe. 1960. «A medium for the cultivation of lactobacilli». J. Appl. Bact., vol. 23, p. 130-135.
- DE SIMONE, C., R. Vesely, B. Bianchi Salvadori et E. Jirillo. 1993. «The role of probiotics in modulation of the immune system in man and in animals». Int. J. Immunotherapy, vol. 1, p. 23-28.
- DE VUYST, L. et B. Degeest. 1999. «Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria». FEMS Microbiol. Rev., vol. 23, p. 153-177.
- DE VUYST, L., F. Vanderveken, S. Van De Ven et B. Degeest. 1998. «Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis». J Appl. Microbiol., vol. 84, p. 1059-1068.
- DEETH H.C. et A.Y. Tamine. 1981. «Yogurt : Nutritive and therapeutic aspects». J. Food Protect., vol. 44, p. 78-86.
- DEGEEST, B. et L. De Vuyst. 1999. «Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium». Appl. Env. Microbiol., vol. 65, p. 2863-2870.
- DINARELLO, C.A., J.G. cannon, S.M. Wolff *et al.*, 1986. «Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1». J. Exp. Med., vol. 163, p. 1433.
- DUGAS, B., A. Mercenier, I. Lenoir-Wijnkoop, C. Arnaud, N. Dugas et É. Postaire. 1999. «Immunity and probiotics». Trends Immunol. Today, vol. 20, no. 9, p. 387-390.
- DUNNE, D.W., D. Resnick, J. Greenberg, M. Krieger et K.A. Joiner. 1994. «The type I macrophage scavenger receptor binds to Gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 91, p. 1863-1867.
- DUPONT, I., D. Roy et G. Lapointe. 2000. «Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk». J. Ind. Microbiol. Biotech., vol. 24, p. 251-255.

- ERB, K.J., J.W. Holloway, A. Sobeck, H. Moll et G. Le Gros. 1998. «Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-Bacillus Calmette-Guérin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia». J. Exp. Med., vol. 187, p. 561-569.
- ESTRADA, A., C.-H. Yun, A. Van Kessel, B. Li, S. Hauta et B. Laarveld. 1997. «Immunomodulatory activities of oat β -glucan *in vitro* and *in vivo*».
- FERNANDES, C.F. et K.M. Shahani. 1990. «Anticarcinogenic and immunological properties of dietary lactobacilli». J. Food Prot., vol. 53, p. 704-710.
- FETLINSKI, A. et L. Stepaniak. 1994. «Sensitivity of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* to bile salt». Article sur internet: www.ias.unu.edu/vfellow/foo/ecotec/ecotech94/paper-09.htm. Consulté le 03/11/98, en ligne.
- FLESCHE, I.E.A., J. H. Hess, S. Huang, M. Aguet, J. Rothe, H. Bluethmann et S.H.E. Kaufmann. 1995. «Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon γ and tumor necrosis factor α ». J. Exp. Med., vol. 181, p. 1615-1621.
- FULLER, R. 1989. «Probiotics in man and animals». J. Appl. Bact., vol. 66, p. 365-378.
- GAMAR, L., K. Blondeau et J.-M. Simonet. 1997. «Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83». J. Appl. Microbiol., vol. 83, p. 281-287.
- GAMAR-NOURANI, L., K. Blondeau et J.-M. Simonet. 1998. «Influence of culture conditions on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83». J. Appl. Microbiol., vol. 85, p. 664-672.
- GANCEL, F. et G. Novel. 1994. «Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 1. Conditions of production». J. Dairy Sci., vol. 77, p. 685-688.
- GIAIMIS, J., Y. Lombard, P. Fonteneau, C.D. Muller, R. Levy, M. Makaya-Kumba, J. Lazdins et P. Poindron. 1993. «Both mannose and β -glucan receptors are involved in phagocytosis of unopsonized, heat-killed *Saccharomyces cerevisiae* by murine macrophages». J. Leukoc. Biol., vol. 54, p. 564-571.
- GOODRICH, M.E. et D.W. McGEE. 1998. «Regulation of mucosal B cell immunoglobulin secretion by intestinal epithelial cell-derived cytokines». Cytokine, vol. 12, p. : 948-955.
- GOUGEON, M.L. 1993. «Cytokines et lymphocytes B : l'action conjointe des cytokines». Chap. In Cavaillon, J.-M. Les cytokines, Paris, Masson éditeur, p.249-261.
- GOULET, J. 1984. «Laits et produits laitiers fermentés». Chap. In Julien, J.P., J.P. Nadeau et R. Dumais, éditeurs. Science et technologie du lait. Québec : La Fondation de

Technologie Laitière du Québec Inc., et les Presses de l'Université Laval, p. 347-358.

GROBBEN, G.J., J. Sikkema, M.R. Smith et J.A.M. De Bont. 1995. «Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium». J. Appl. Bact., vol. 79, p. 103-107.

GROBBEN, G.J., M.R. Smith, J. Sikkema et J.A.M. De Bont. 1996. «Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 46, p. 279-284.

HAEFFNER-CAVAILLON, N. et J.-M. Cavaillon. 1993. «Cytokines et inflammation». Chap. In Cavaillon, J.-M. Les cytokines, Paris, Masson éditeur, p. 341-358.

HALPERN, G.M., K.G. Vruwink, J. Van de Water, C.L. Keen et M.E. Gershwin. 1991. «Influence of long-term yoghurt consumption in young adults». Int. J. Immunoth., vol. 7, p. 205-210.

HAMANN, L., V. El-Samalouti, A.J. Ulmer, H.-D. Flad et E.T. Rietschel. 1998. «Components of gut bacteria as immunomodulators». Int. J. Food Microbiol., vol. 41, p. 141-154.

HARTLEY, D.L. et G. Denariáz. 1993. «The role of lactic acid bacteria in yogurt fermentation». Int. J. Immunoth., vol. 9, p. 3-17.

HASHIMOTO, M., Y. Imamura, J.-I. Yasuoka, S. Kotani, S. Kusumoto et Y. Suda. 1999. «A novel cytokine-inducing glycolipid isolated from the lipoteichoic acid fraction of *Enterococcus hirae* ATCC 9790: a fundamental structure of the hydrophilic part». Glycoconjugate J., vol. 16, p. 213-221.

HAYDAY, A.C. 2000. « $\gamma\delta$ cells : a right time and a right place for a conserved third way of protection». Annu. Rev. Immunol., vol. 18, p. 975-1026.

HAYGLASS, K.T. et B.P. Stefura. 1991. «Anti-interferon γ treatment blocks the ability of glutaraldehyde-polymerized allergens to inhibit specific IgE responses». J. Exp. Med., vol. 173, p. 279-285.

HEINZEL, F.P., A.M. Hujer, F.N. Ahmed et R.M. Rerko. 1997. «In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers». J. Immunol., vol. 158, p. 4381-4388.

HEINZEL, F.P., M.D. Sadick, B.J. Holaday, R.L. Coffman et R.M. Locksley. 1989. «Reciprocal expression of interferon- γ or interleukin-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis». J. Exp. Med., vol. 159, p. 59-72.

HENDERSON, B. et M. Wilson. 1996. «Cytokine induction by bacteria : beyond lipopolysaccharide». Cytokine, vol. 8, p. 269-282.

- HERSHBERG, R.M. et L.F. Mayer. 2000. «Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells—polarity and complexity». Immunol. Today, vol.21, no.3, p. 123-128.
- HEUMANN, D., C. Barras, A. Severin, M.P. Glauser et A. Tomasz. 1994. «Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes». Inf. Imm., vol. 62, p. 2715-2721.
- HILTON, E., H.D. Isenberg, P. Alperstein, K. Frances et M.T. Borenstein. 1992. «Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidal vaginitis». Ann. Int. Med., vol. 116, p. 353-357.
- HLODAN, R. et R.H. Pain. 1995. «The folding and assembly pathway of tumor necrosis factor TNF-alpha, a globular trimeric protein». Eur. J. Biochem., vol. 231, p. 381-387.
- HOLZAPFEL, W.H., P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger et J.H.J Huis In't Veld. 1998. «Overview of gut flora and probiotics». Int. J. Food Microbiol., vol. 41, p. 85-101.
- HUGENHOLTZ, J., E. Looijesteijn, M. Starrenburg et C. Dijkema. 2000. «Analysis of sugar metabolism in an EPS producing *Lactococcus lactis* by ³¹P NMR». J. Biotechnol., vol. 77, p. 17-23.
- ISOLAURI, E., M. Juntunen, t. Rautanen, P. Sillanaukee et T. Koivula. 1991. «A human *Lactobacillus* strain (*L. casei* sp. strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children». Pediatrics, vol. 88, p. 90-97.
- JANEWAY, C.A. et P. Travers. 1997. Immunobiology: the immune system in health and disease. New York: Current Biology Ltd.
- JOHANSSON, M.-L., G. Molin, B. Jeppsson, S. Nobaek, S. Ahrné et S. Bengmark. 1993. «Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup : *in vivo* colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora». Appl. Env. Microbiol., vol. 59, p. 15-20.
- JOUAULT, T., G. Lepage, A. Bernigaud, P.-A. Trinel, C. Fradin, J.-M. Wieruszeski, G. Strecker et D. Poulain. 1995. «β-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* act as signals for tumor necrosis factor alpha production». Inf. Imm., vol. 63, p. 2378-2381.
- JOUSIMIES-SOMER, H. 1997. «Recently described clinically important anaerobic bacteria : taxonomic aspects and update». Clin. Infect. Dis., vol. 25, suppl. 2, p. S78-87.
- KABAT, E.A. et A.E. Bezer. 1958. «The effect of variation in molecular weight on the antigenicity of dextran in man». Arch. Biochem. Biophys., vol. 78, p. 306-318.
- KAISERLIAN, D. et N. Etchart. 1999. «Entry sites for oral vaccines and drugs : a role for M cells, enterocytes and dendritic cells?». Seminars in immunology, vol. 11, p. 217-224.
- 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. Immunopharmac., vol. 13, no. 7, p. 969-975.
- KALKA-MOLL, W., A.O. Tzianabos, Y. Wang, V.J. Carey, R.W. Finberg, A.B. Onderdonk et D.L. Kasper. 2000. «Effect of molecular size on the ability of szwitterionic polysaccharides to stimulate cellular immunity». J. Immunol., vol. 164, p. 719-724.
- KASPER, H. 1998. «Protection against gastrointestinal diseases—Present facts and future developments». Int. J. Food Microbiol., vol. 41, p. 127-131.
- KEISARI, Y., K. Kabha, L. Nissimov, J. Schlepper-Schafer et I. Ofek. 1997. «Phagocyte-bacteria interactions». Adv. Dent. Res., vol. 11, no. 1, p. 43-49.
- KELLER, R., R. Keist et P.W. Joller. 1994. «Macrophage response to bacteria and bacterial products : modulation of Fcy receptors and secretory and cellular activities». Immunology, vol. 81, p. 161-166.
- KELSO, A., AB Troutt, E. Maraskovsky, NM Gough, L. Morris, MH Pech et JA Thomson. 1991. «Heterogeneity in lymphokine profiles of CD4+ and CD8+ T cells and clones activated in vivo and in vitro». Immunol. Rev., vol. 123, p. 85-114.
- KIMURA, K., A.L. McCartney, M.A. McConnell et G.W. Tannock. 1997. «Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains». Appl. Env. Microbiol., vol. 63, p. 3394-3398.
- KITAZAWA, H., T. Itoh et T. Yamaguchi. 1991a. «Induction of macrophage cytotoxicity by slime products produced by encapsulated *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*». Anim. Sci. Technol. (Jpn.), vol. 62, p. 861-866.
- KITAZAWA, H., T. Toba, T. Itoh, N. Kumano et S. Adachi. 1990. «Antitumor activity of ropy sour milk in murine solid tumor». Jpn. J. Zootech. Sci., vol. 61, no. 11, p. 1033-1039.
- KITAZAWA, H., T. Toba, T. Itoh, N. Kumano, S. Adachi et T. Yamaguchi. 1991b. «Antitumoral activity of slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* isolated from Scandinavian ropy sour milk, "viili"». Anim. Sci. Technol. (Jpn.), vol. 62, p. 277-283.
- KITAZAWA, H., T. Yamaguchi, M. Miura, T. Saito et T. Itoh. 1993. «B-cell mitogen produced by slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* isolated from ropy sour milk, viili». J. Dairy Sci., vol. 76, p. 1514-1519.
- KLEEREBEZEM, M., R. van Kranenburg, R. Tuinier, I.C. Boels, P. Zoon, E. Looijesteijn, J. Hugenholtz et W.M. de Vos. 1999. «Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*: from genetic engineering to improved rheological properties?». Antonie van Leeuwenhoek, vol. 76, p. 357-365.

KLEIN, G., A. Pack, C. Bonaparte et G. Reuter. 1998. «Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria». Int. J. Food Microbiol., vol. 41, p. 103-125.

KOHNO, K. et M. Kurimoto. 1998. «Interleukin 18, a cytokine which resembles IL-1 structurally and IL-12 functionally but exerts its effect independently of both». Clin. Immunol. Immunopath., vol. 86, no. 1, p. 11-15.

KUBY, J. 1997. Immunology. New York: W.H. Freeman and Company, 664 p.

LAGACÉ, J. et P. Dubreuil. 1999. «1) Réactivation des défenses naturelles de l'hôte par l'utilisation d'inhibiteurs liposomaux anti-exopolysaccharides muqueux; 2) Mise au point d'une trousse de diagnostic avec sondes à ADN permettant l'identification rapide des bactéries responsables de la mammite bovine». Longueuil: Forum technologique Novalait, fiche P99-18.

LECLERC, C. 1993. «Sous-populations Th1 et Th2». Chap. In Cavaillon, J.-M. Les cytokines, Paris, Masson éditeur, p. 207-222.

LEE, J.-H. 1998. «Immunostimulative effect of commercial bifidobacteria used in yogurt culture starters». Food Sc. Biotech., vol. 7, p. 46-50.

LEREBOURS, E. et S. Somerset. 1993. «Yogurt and lactase deficiency». Int. J. Immunoth., vol. 9, p. 19-22.

Les cytokines. Paris : Masson, Éditeur, 412 p.

LI, S.P., S.-I. Lee et J.E. Dimer. 1998. «Alterations in frequency of interleukin-2 (IL-2)-, gamma interferon-, or IL-4-secreting splenocytes induced by *Candida albicans* mannan and/or monophosphoryl lipid A». Inf. Imm., vol. 66, p. 1392-1399.

LICHTMAN, S.N., J. Keku, J.H. Schwab et R.B. Sartor. 1991. «Evidence for peptidoglycan absorption in rats with experimental small bowel bacterial overgrowth». Inf. Imm., vol. 59, p. 555-562.

LOOIJESTEIJN, P.J., I.C. Boels, M. Kleerebezem et J. Hugenholtz. 1999. «Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* by the sugar source». Appl. Env. Microbiol., vol. 65, p. 5003-5008.

LUCKEY, T.D. and M.H. Floch. 1972. «Introduction to intestinal microecology». Am. J. Clin. Nutr., vol. 25, p. 1291-1295.

MA, X., J. Sun, E. Papasavvas, H. Riemann, S. Robertson, J. Marshall, R.T. Bailer, A. Moore, R.P. Donnelly, G. Trinchieri et L.J. Montaner. 2000. «Inhibition of IL-12 production in human monocyte-derived macrophages by TNF». J. Immunol., vol. 164, p. 1722-1729.

MARIN, M.L., J.H. Lee, J. Murtha, Z. Ustunol et J.J. Pestka. 1997a. «Differential cytokine production in clonal macrophage and T-cell lines cultured with bifidobacteria».

J. Dairy Sci., vol. 80, p. 2713-2720.

MARIN, M.L., M.V. Tejada-Simon, J. Murtha, Z. Ustunol et J.J. Pestka. 1997b. «Effects of *Lactobacillus* spp. on cytokine production by RAW 264.7 macrophage and EL-4 thymoma cell lines». J. Food Protect., vol. 60, p. 1364-1370.

MARIN, M.L., M.V. Tejada-Simon, J.H. Lee, J. Murtha, Z. Ustunol et J.J. Pestka. 1998. «Stimulation of cytokine production in clonal macrophage and T-cell models by *Streptococcus thermophilus* : comparison with *Bifidobacterium* sp. and *Lactobacillus bulgaricus*». J. Food Prot., vol. 61, p. 859-864.

MARSHALL, K.D., R. Stout et R. Micheli. 1971. «Selective sorption of bacteria from seawater». Can. J. Microbiol., vol. 17, p. 1413-1416.

MARTEAU, P. et J.C. Rambaud. 1993. «Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man». FEMS Microbiol. Rev., vol. 12, p. 207-220.

MATSUZAKI, G., K. Hiroyuki, S. Fujise, N. Kobayashi, K. Kishihara et K. Nomoto. 1996. «Extrathymic development of self-reactive $\gamma\delta$ T cells in athymic BALB/c *nu/nu* mice». Cell. Immunol., vol. 173, p. 49-54.

MATSUZAKI, T. 1998. «Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota». Int. J. Food Microbiol., vol. 41, p. 133-140.

McDONALD, H.R., C. Blanc, R.K. Lees et B. Sordat. 1987. «Development of t-dependant immune function in nude mice». Rygaard, , Brunner, Graem, Spang-Thomsen, (éd.) Immune-deficient animals in biomedical research. In 5th international workshop on immune-deficient animals (Copenhagen, 13-16 octobre 1985). Basel : Karger, p. 51-58.

McKNIGHT, A.J., G.J. Zimmer, I. Figelman, S.F. Wolf et A.K. Abbas. 1994. «Effects of IL-12 on helper T cell-dependent immune responses in vivo». J. Immunol., vol. 152, p. 2172-2179.

MECHERI, S. 1993. «Interleukine-12». Chap. In Cavaillon, J.-M. Les cytokines, Paris, Masson éditeur, p.297-303.

MESSINA, J.P., G.S. Gilkeson et D.S. Pisetsky. 1991. «Stimulation of *in vitro* murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA». J. Immunol., vol. 147, p. 1759-1764.

METCHNIKOFF, E. 1908. The prolongation of life. New York : G.P. Putman's Sons, 1ere édition.

MICHEL, L., D. Uccelletti, C. Palleschi et V. Crescenzi. 1999. «Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 53, p. 69-74.

MIDOLO, P.D., J. R. Lambert, R. Hull, F. Luo et M.L. Grayson. 1995. «In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria».

J. Appl. Bact., vol. 79, p. 475-479.

MIETTINEN, M., J. Vuopio-Varkila et K. Varkila. 1997. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. Inf. Imm., vol. 64, p. 5403-5405.

MIETTINEN, M., S. Matikainen, J. Vuopio-Varkila, J. Pirhonen, K. Varkila, M. Kurimoto et I. Julkunen. 1998. «Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells». Inf. Imm., vol. 66, p. 6058-6062.

MIGLIORINI, P., G. Corradin et S.B. Corradin. 1991. «Macrophage NO₂-production is a sensitive and rapid assay for the quantitation of murine IFN-gamma». J. Immunol., vol. 17, p. 107-114.

MOON, A. and R.E. Kleinman. 1995. «Allergic gastroenteropathy in children». Ann. Allergy Asthma Immunol., vol. 74, p. 5-12.

MOZZI, F., G. Savoy de Giori, G. Oliver et G. Font de Valdez. 1995. «Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei*. II. Influence of the carbon source». Milchwissenschaft, vol. 50, p. 307-309.

MÜLLER-ALOUF, H., J.E. Alouf, D. Gerlach, J.-H. Ozergowski, C. Fitting et J.-M. Cavaillon. 1994. «Comparative study of cytokine release by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with *Streptococcus pyogenes* superantigenic erythrogenic toxins, heat-killed streptococci, and lipopolysaccharide». Inf. Imm., vol. 62, p. 4915-4921.

MUROSAKI, S., Y. Yamamoto, K. Ito, T. Inokuchi, H. Kusaka, H. Ikeda et Y. Yoshikai. 1998. «Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production by stimulation of Il-12 production in mice». J. Allergy Clin. Immunol., vol. 102, p. 57-64.

NAKAJIMA, H. 1995. «Characteristics of fermented milk products by slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*». Snow Brand R&D Reports, vol. 104, p. 97-99.

NAKAJIMA, H., S. Toyoda, T. Toba, T. Itoh, T. Mukai, H. Kitazawa et S. Adachi. 1990. «A novel phosphopolysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SBT 0495». J. Dairy Sci., vol. 73, p. 1472-1477.

NOPHAR, Y., O. Kemper et C. Brakebusch. 1990. «Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNFRs) : the cDNA for the type I TNFR, cloned using amino acid sequence of the receptor». EMBO J., vol. 9, p. 3269-3278.

NORISUYE, T., T. Yanaki, et H. Fujita. 1980. «Triple helix of a *Schizophyllum commune* polysaccharide in aqueous solution». J. Polymer Sci., vol. 18, p. 547-558.

OGLE, C.K., X. Guo, P.O. Hasselgren, J.D. Ogle et J.W. Alexander. 1997. «The gut as a

source of inflammatory cytokines after stimulation with endotoxin». Eur. J. Surg., vol. 163, p. 45-51.

OKAMURA, H., S. Kashiwamura, H. Tsutsui, T. Yoshimoto et N. Nakanishi. 1998. «Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18». Curr. Opin. Immunol., vol. 10, p. 259-264.

PEDERSON, S.S., A. Kharazmi, F. Espersen et N. Hoiby. 1990. «*Pseudomonas aeruginosa* alginate in cystic fibrosis sputum and the inflammatory response». Inf. Imm., vol. 58, p. 3363-3368.

PERDIGON, G., J.C. Valdez et M. Rachid. 1998. «Antitumour activity of yogurt : study of possible immune mechanisms». J. Dairy Res., vol. 65, p. 129-138.

PERDIGON, G., M. Medici, M.E. Bibas Bonet de Jorrat, M. Valverde de Budeguer et A. Pesce de Ruiz Holgado. 1993. «Immunomodulating effects of lactic acid bacteria on mucosal and tumoral immunity». Int. J. Immunoth., vol. 9, p. 29-52.

PERDIGON, G., S. Alvarez, M. Rachid, G. Agüero et N. Gobbato. 1995. «Immune system stimulation by probiotics». J. Dairy Sci., vol. 78, p. 1597-1606.

PIARD, J.C. et M. Desmazeaud. 1992. «Inhibitory factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocin and other antibacterial substances». Lait, vol. 72, p. 113-142.

POOL-ZOBEL, B.L., C. Neudecker, I. Domizlaff, S. Ji, U. Schillinger, C. Rumney, M. Moretti, I. Vilarini, R. Scassellati-Sforzolini et I. Rowland. 1996. «Lactobacillus and bifidobacterium-mediated antigenotoxicity in the colon of rats». Nutr. Can., vol. 26, p. 365-380.

PORTIER, A., N.P. Boyaka, F. Bougoudogo, M. Dubarry, J.F. Huneau, D. Tomé, A. Dodin et M. Coste. 1993. «Fermented milks and increased antibody responses against cholera in mice». Int. J. Immunoth., vol. 9, p. 217-224.

PRIGOZY, T.I., P.A. Sieling, D. Clemens, P.L. Stewart, S.M. Behar, S.A. Porcelli, M.B. Brenner, R.L. Modlin et M. Kronenberg. 1997. «The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules». Immunity, vol. 6, p. 187-197.

PURI, P., A. Rattan, R.L. Bijlani, S.C. Mahapatra et I. Nath. 1996. «Splenic and intestinal lymphocyte proliferation response in mice fed milk or yogurt and challenged with *Salmonella typhimurium*». Int. J. Food Sci. Nutr., vol. 47, p. 391-398.

RANGAVAJHYALA, N., K.M. Shahani, G. Sridevi et S. Srikumaran. 1997. «Nonlipopolysaccharide components of *Lactobacillus acidophilus* stimulate the production of interleukine-1 α and tumor necrosis factor- α by murine macrophages». Nutr. Canc., vol. 28, p. 130-134.

REID, G., C. Tieszer et D. Lam. 1995. «Influence of lactobacilli on the adhesion of

- Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* to fibers and epithelial cells». J. Ind. Microbiol., vol. 15, p. 248-253.
- REUBER, T.L. et G.C. Walker. 1993. «Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*». Cell, vol. 74, p. 269-280.
- RICCIARDI, A. et F. Clementi. 2000. «Exopolysaccharides from lactic acid bacteria : structure, production and technological applications». Ital. J. Food Sci., vol. 12, p. 23-45.
- ROJAS, M. and P.L. Conway. 1996. «Colonisation by lactobacilli of piglet small intestinal mucus». J. Appl. Bact., vol. 81, p. 474-480.
- ROMAGNANI, S. 1996. «Th1 and Th2 in human diseases». Clin. Imm. Immunopath., vol. 80, p. 225-235.
- ROOK, G.A.W. et J.L. Stanford. 1998. «Give us this day our daily germs». Immunol. Today, vol. 19, p. 113-116.
- ROSS, G.D. et V. Vetvicka. 1993. «CR3 (CD11b, CD18) : a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions». Clin. Exp. Immunol., vol. 92, p. 181-184.
- RYCHEN, G. et C. S. Nunes. 1995. «Effets des flores lactiques des produits laitiers fermentés : une base scientifique pour l'étude des probiotiques microbiens dans l'espèce porcine». INRA Prod. Anim., vol. 8, p. 97-104.
- 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., vol. 155, p. 650-655.
- SALKOWSKI, C.A., G. Detore, R. McNally, N. van Rooijen et S.N. Vogel. 1997. «Regulation of inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression and nitric oxide production by lipopolysaccharide in vivo». J. Immunol., vol. 158, p. 905-912.
- SCHIFFRIN, E.J., F. Rochat, H. Link-Amster, J.M. Aeschlimann et A. Donnet-Hugues. 1995. «Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria». J. Dairy Sci., vol. 78, p. 491-497.
- SCHRIJVER, I.A., M.-J. Melief, F. Eulerink, M.P. Hazenberg et J.D. Laman. 1999. «Bacterial peptidoglycan polysaccharides in sterile human spleen induce proinflammatory cytokine production by human blood cells». J. Inf. Dis., vol. 179, p. 1459-1468.
- SCHWAB, J.H. 1993. «Phlogistic properties of peptidoglycan-polysaccharide polymers from cell walls of pathogenic and normal-flora bacteria which colonize humans». Inf. Imm., vol. 61, p. 4535-4539.

- SCHWANDNER, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe et C.J. Kirschning. 1999. «Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2». J. Biol. Chem., vol. 274, p. 17406-17409.
- SEKINE, K., E. Watanabe-Sekine, T. Toida, T. Kasashima, T. Kataoka et Y. Hashimoto. 1994. «Adjuvant activity of the cell wall of *Bifidobacterium infantis* for *in vivo* immune responses in mice». Immunopharm. Immunotox., vol. 16, p. 589-609.
- SHIDA, K., K. Makino, A. Morishita, K. Takamizawa, S. Hachimura, A. Ametani, T. Sato, Y. Kumagai, S. Habu et S. Kaminogawa. 1998. «*Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures». Int. Arch. Allergy Immunol., vol. 115, p. 278-287.
- SKEEN, M.J., M.A. Miller, TM. Shinnick et H.K. Ziegler. 1996. «Regulation of murine macrophage IL-12 production. Activation of macrophages *in vivo*, restimulation *in vitro*, and modulation by other cytokines». J. Immunol., vol. 156, p. 1196-1206.
- SMITH, R.A. et C. Baglioni. 1987. «The active form of tumor necrosis factor is a trimer». J. Biol. Chem., vol. 262, p. 6951-6954.
- SNAPPER, C.M. et J.J. Mond. 1996. «A model for induction of T cell-independent humoral immunity in response to polysaccharide antigens». J. Immunol., vol. 157, p. 2229-2233.
- SOLIS-PEREYRA, B., N. Aattouri et D. Lemonnier. 1997. «Role of food in the stimulation of cytokine production». Am. J. Clin. Nutr., vol. 66, p. 521S-525S.
- SONG, F., G. Matsuzaki, M. Mitsuyama et K. Nomoto. 1996. «Differential effects of viable and killed bacteria on IL-12 expression of macrophages». J. Imm., vol. 156, p. 2979-2984.
- SPANHAAK, S., R. Havenaar et G. Schaafsma. 1998. «The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans». Eur. J. Clin. Nutr., vol. 52, p. 899-907.
- STANDIFORD, T.J., D.A. Arenberg, J.M. Danforth, S.L. Kunkel, G.M. VanOtteren. et R.M. Strieter. 1994. «Lipoteichoic acid induces secretion of interleukin-8 from human blood monocytes : a cellular and molecular analysis». Inf. Imm., vol. 62, p. 119-125.
- STILES, M.E. et W.H. Holzapfel. 1997. «Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy». Int. J. Food Microbiol., vol. 36, p. 1-29.
- STIMPSON, S.A., R.R. Brown, S.K. Anderle, D.G. Klapper, R.L. Clark, W.J. Cromartie et J.H. Schwab. 1986. «Arthropathic properties of cell wall polymers from normal flora bacteria». Inf. Imm., vol. 51, p. 240-249.
- STINGELE, F., J.-R. Neeser et B. Mollet. 1996. «Identification and characterisation of the *eps* (exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6». J. Bact.,

vol. 178, p. 1680-1690.

STREDANSKY, M., E. Conti, L. Navarini et C. BERTOCCHI. 1999. «Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation». Process Biochem., vol. 34, p. 11-16.

TAKAHASHI, T., T. Oka, H. Iwana, T. Kuwata et Y. Yamamoto. 1993. «Immune response of mice to orally administered lactic acid bacteria». Biosci. Biotech. Biochem., vol. 57, p. 1557-1560.

TAKEUCHI, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda et S. Akira. 1999. «Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components». Immunity, vol. 11, p. 443-451.

TANNOCK G.W. 1997. «Probiotic properties of lactic acid bacteria : plenty of scope for fundamental R&D». Trends Biotechnol., vol. 15, p. 270-274.

TAPPING, R.I., S. Akashi, K. Miyake, P.J. Godowski et P.S. Tobias. 2000. «Toll-like receptor 4, but not Toll-like receptor 2, is a signaling receptor for *Escherichia* and *Salmonella* lipopolysaccharides». J. Immunol., vol. 165, p. 5780-5787.

TEJADA-SIMON, M.V., Z. Ustunol et J.J. Pestka. 1999. «*Ex vivo* effects of lactobacilli, streptococci, and bifidobacteria ingestion on cytokine and nitric oxide production in a murine model». J. Food Prot., vol. 62, p. 162-169.

TEPPER, R.I., H.J. Burstein, P. Leder *et al.* 1992. «Immunologic effects of interleukin-4 in vivo : studies with transgenic mice». Chap. In Spits, H., éditeur. IL-4 :structure and function. London, CRC Press, p. 205-220.

THIBAUT, J. et A. LeDuy. 1999. «Pullulan, microbial production methods». In M.C. Flickinger et S.W. Drew. In Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1999, p. 2232-2247.

THOMAS, C.A., Y. Li, T. Kodama, H. Suzuki, S. Silverstein et J. El Khoury. 2000. «Protection from lethal Gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependant phagocytosis». J. Exp. Med., vol. 191, p. 147-155.

TRAPP, C.L., C.C. Chang, G.M. Halpern, C.L. Keen et M.E. Gershwin. 1993. «The influence of chronic yogurt consumption on populations of young and elderly adults». Int. J. Immunoth., vol. 9, p. 53-64.

TREMBLAY, P., M. Houde, N. Arbour, D. Rochefort, S. Masure, R. Mandeville, G. Opdenakker et D. Oth. 1995. «Differential effects of PKC inhibitors on gelatinase B and interleukin-6 production in the mouse macrophage». Cytokine, vol. 7, p. 130-136.

VAN CASTEREN, W.H.M., C. Dijkema, H.A. Schols, G. Beldman et A.G.J. Voragen. 2000. «Structural characterisation and enzymatic modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* B39». Carbohydrate Res., vol. 324, p. 170-

181.

VAN GEEL-SCHUTTEN, G.H., E.J. Faber, E. Smit, K. Bonting, M.R. Smith, B. Ten Brink, J.P. Kamerling, J.F.G. Vliegthart et L. Dijkhuizen. 1999. «Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains». Appl. Env. Microbiol., vol. 65, p. 3008-3014.

VAN KRANENBURG, R., I.C. Boels, M. Kleerebezem et W.M. de Vos. 1999. «Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food : approaches for the production of existing and novel polysaccharides». Curr. Opin. Biotechnol., vol. 10, p. 498-504.

VAN KRANENBURG, R., J.D. Marugg, N.J. Willem, I.I. van Swam et W.M. de Vos. 1997. «Molecular characterization of the plasmid-encoded *eps* gene cluster essential for exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis*». Mol. Microbiol., vol. 24, p. 387-397.

VANHAVERBEKE, C., C. Bosso, P. Colin-Morel, C. Gey, L. Gamar-Nourani, K. Blondeau, J.-M. Simonet et A. Heyraud. 1998. «Structure of an extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83». Carbohydrate Res., vol. 313, p. 211-220.

VELRAEDS, M.M.C., H.C. Van der Mel, G. Reid et H.J. Busscher. 1996. «Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates». Appl. Env. Microbiol., vol. 62, p. 1958-1963.

VETVICKA, V., B.P. Thornton et G.D. Ross. 1996. «Soluble β -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., vol. 98, no. 1, p. 50-61.

WANG, Y., S.P. Li, S.A. Moser, K.L. Bost et J.E. Dömer. 1998. «Cytokine involvement in immunomodulatory activity affected by *Candida albicans* mannan». Inf. Imm., vol. 66, p. 1384-1391.

WEIDEMANN, B., H. Brade, E.T. Rietschel, R. Dziarski, V. Bazil, S. Kusumoto, H.-D. Flad et A.J. Ulmer. 1994. «Soluble peptidoglycan-induced monokine production can be blocked by anti-CD14 monoclonal antibodies and by lipid A partial structures». Inf. Imm., vol. 62, p. 4709-4715.

WEIDEMANN, B., J. Schletter, R. Dziarski, S. Kusumoto, F. Stelter, E.T. Rietschel, H.-D. Flad et Ulmer. 1997. «Specific binding of soluble peptidoglycan and muramyl dipeptide to CD14 on human monocytes». Inf. Imm., vol. 65, p. 858-864.

WEINER, R., S. Langile et E. Quintero. 1995. «Structure, functions and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides». J. Ind. Microbiol., vol. 15, p. 339-346.

WENNER, C.A., M. Güler, S.E. Macatonia, A. O'Garra et K.M. Murphy. 1996. «Roles of IFN- γ and IFN- α in IL-12-induced T helper cell-1 development». J. Immunol., vol. 156, p. 1442-1447.

WHEELER, J.G., M.L. Bogle, S.J. Shema, M.A. Shirrell, K.C. Stine, A.J. Pittler, A.W. Burks et R.M. Helm. 1997. «Impact of dietary yogurt on immune function». Am. J. Med. Sci., vol. 313, p. 120-123.

WHEELER, J.G., S.J. Shema, M.L. Bogle, M.A. Shirrell, A.W. Burks, A. Pittler et R.M. Helm. 1997. «Immune and clinical impacts of *Lactobacillus acidophilus* on asthma». Ann. All. Asthm. Imm., vol. 79, p. 229-233.

WU, C.-Y., C. Demeure, M. Kiniwa, M. Gately et G. Delespesse. 1993. «IL-12 induces the production of IFN- γ by neonatal human CD4 T cells». J. Immunol., vol. 151, p. 1938-1949.

YAMAOKA, Y., T. Kawakita, M. Kaneko et K. Nomoto. 1995. «A polysaccharide fraction of Shosaiko-to active in augmentation of natural killer activity by oral administration». Biol. Pharm. Bull., vol. 18, p. 846-849.

YASUI, H., K. Shida, T. Matsuzaki et T. Yokokura. 1999. «Immunomodulatory function of lactic acid bacteria». Antonie van Leeuwenhoek, vol. 76, p. 383-389.

YASUTAKE, N., T. Matsuzaki, K. Kimura, S. Hashimoto, T. Yokokura et Y. Yoshikai. 1999. «The role of tumor necrosis factor (TNF)- α in the antitumor effect of intrapleural injection of *Lactobacillus casei* strain Shirota in mice». Med. Microbiol. Immunol., vol. 188, p. 9-14.

YOSHIMURA, A., E. Lien, R.R. Ingalls, E. Tuomanen, R. Dziarski et D. Golenbock. 1999. «Recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2». J. Immunol., vol. 163, p. 1-5.

YOUNG, H.A. et K.J. Hardy. 1990. «Interferon γ : producer cells, activation stimuli and molecular genetic regulation». Pharmac. Ther., vol. 45, p. 137-151.

YU, J., A. Peñaloza-Vázquez, A.M. Chakrabarty et C.L. Bender. 1999. «Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*». Mol. Microbiol., vol. 33, 712-720.

ZOLLNER, T.M., H.-G. Zhu et A. Anderer. 1993. «Induction of NK-like activity in T cells by IL-2/anti-CD3 is linked to expression of a new antitumour receptor with specificity for acetylated mannose». Anticancer Res., vol. 13, p. 923-930.

ZUBLER, R.H., C. Werber-Favre, L. Wen, K.-I. Sekita et C. Straub. 1987. «Theoretical and practical aspects of B-cell activation : murine and human systems». Immunol. Rev., vol. 99, p. 281-299.