



Université du Québec

**Institut national de la recherche scientifique**

INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

Mémoire présenté au  
centre de recherche en santé humaine  
de l'INRS-Institut Armand-Frappier  
comme exigence partielle du programme de  
maîtrise en virologie et immunologie

Par

Louis de Léséleuc

**Étude comparative de la modulation de l'immunité par  
des bactéries lactiques**

Janvier 2001

Direction: Daniel Oth

Co-direction: Monique Lacroix, Denis Roy



À mes parents, Pierre et Diane,  
pour leurs encouragements et  
leur patience



## RÉSUMÉ

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes utilisés dans l'industrie alimentaire pour la fabrication de différents produits fermentés, comme le yogourt ou le fromage. Certaines de ces bactéries sont présentes à l'état naturel dans le tractus gastro-intestinal et entrent en relation symbiotique avec leur hôte. Plusieurs auteurs ont attribué à ces bactéries des rôles importants dans l'homéostasie de l'hôte. Un des rôles remplis par ces bactéries serait la stimulation du système immunitaire. Un des préceptes établis est que cette action modulatrice est hétérogène. La nature et l'intensité de la réponse immunitaire varient selon l'espèce ou la souche de la bactérie impliquée.

Nous avons utilisé un modèle murin *in vitro* afin d'effectuer une étude comparative de 9 souches de bactéries lactiques en se basant sur leur capacité d'induire l'expression de cytokines. Des cellules spléniques de souris C57BL/6 furent cultivées en présence de 3 concentrations de bactéries lactiques inactivées. La production de TNF et d'IL-12 après 6h, et d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4 après 24h, fut mesurée par dosage de l'ARN messager (par RT-PCR) et par bioessai ou par ELISA. De plus, un modèle *in vivo* utilisant des souris immunosupprimées fut mis sur pied afin d'étudier un hypothétique pouvoir "d'immuno-restauration" des bactéries lactiques. Des souris irradiées furent gavées pendant 12 jours avec un mélange de 3 souches de bactéries viables. Par la suite, la capacité de leurs cellules spléniques à répondre à un stimulus (concanavaline A) fut mesurée par dosage de l'IFN- $\gamma$ .

*In vitro*, des différences importantes ont été observées selon la bactérie utilisée et la dose administrée. Les bactéries *L. rhamnosus* ATCC 53103, *L. johnsonii* C4, *L. delbruckeii susp. lactis* R187, *L. acidophilus* R052 et *S. thermophilus* R083 ont démontré une activité stimulatrice pour le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$  et l'IL-12 à toutes les concentrations de bactéries ( $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  UFC/mL). L'expression du gène codant pour l'IL-4 était négligeable dans tous les cas, suggérant une polarisation de la réponse adaptative vers un profil Th1. À haute concentration ( $10^7$  UFC/mL), la plupart des autres bactéries ont pu stimuler la sécrétion d'IFN- $\gamma$ . À basse/moyenne concentrations ( $10^5$ - $10^6$  UFC/mL), la

production d'IFN- $\gamma$  était proportionnelle à la concentration de bactéries et dépendante de la sécrétion d'IL-12 telle que mesurée par ELISA après 24h.

*In vivo*, des souris irradiées et gavées avec le mélange de bactéries lactiques n'ont pas manifesté une capacité accrue à produire de l'IFN- $\gamma$ . Le niveau moyen de production d'IFN- $\gamma$  provenant de splénocytes de six souris irradiées gavées avec des bactéries était même inférieur à celui mesuré à partir des splénocytes de six souris irradiées gavées avec une solution contrôle. Il reste à savoir si cet effet est le résultat d'une inhibition directe ou une conséquence indirecte de l'irradiation.

Notre série d'expériences nous a permis de dépeindre l'action inductrice des bactéries lactiques sur la sécrétion des cytokines, et de discriminer les souches ou espèces de bactéries qui auraient le meilleur potentiel d'activation lorsque administrées à un organisme. Nos expériences ont également illustré l'importance que représente l'élaboration d'un modèle animal pour l'évaluation des effets des bactéries lactiques sur l'immunité *in vivo*.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>Résumé</b> .....	<b>v</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>vii</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>xi</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>xv</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Revue bibliographique</b> .....	<b>5</b>
1    Historique.....	5
2    Les bactéries lactiques.....	6
2.1    Définitions.....	6
2.2    Physiologie des bactéries lactiques.....	7
3    Les cytokines et le système immunitaire.....	10
3.1    La réponse non-adaptative et l'inflammation.....	10
3.2    Facteur nécrosant des tumeurs (TNF).....	11
3.2.1    Structure.....	11
3.2.2    Récepteurs du TNF.....	13
3.2.3    Induction et production.....	14
3.2.4    Effets biologiques.....	15
3.3    Interleukine-12.....	16
3.3.1    Structure.....	16
3.3.2    Récepteur de l'IL-12.....	17
3.3.3    Induction et production.....	18
3.3.4    Effets biologiques.....	18
3.4    La réponse adaptative.....	20
3.4.1    Th1 versus Th2.....	20
3.5    L'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ).....	22
3.5.1    Structure.....	22
3.5.2    Récepteur de l'IFN- $\gamma$ .....	22
3.5.3    Induction et production.....	23
3.5.4    Effets biologiques.....	24
3.6    L'interleukine-4.....	27

3.6.1	Structure .....	27
3.6.2	Récepteur de l'IL-4 .....	27
3.6.3	Induction et production .....	27
3.6.4	Effets biologiques .....	28
4	Effets des bactéries lactiques sur l'immunité .....	29
4.1	Études <i>in vitro</i> .....	29
4.2	Études <i>in vivo</i> .....	32
4.3	Essais cliniques .....	36
4.4	Modèle d'action .....	38
	<b>Méthodologie</b> .....	<b>41</b>
1	Préparation des bactéries .....	41
2	Souris .....	42
3	Préparation de cellules spléniques .....	43
4	Stimulation de cellules spléniques .....	43
5	Dosage des cytokines .....	45
5.1	Dosage du TNF par bioessai .....	45
5.2	Dosage de l'IFN- $\gamma$ par bioessai .....	46
5.3	Dosage de l'IL-12p40 par ELISA .....	48
6	RT-PCR de gènes de cytokines .....	48
6.1	Extraction de l'ARN et génération de l'ADNc .....	48
6.2	PCR semi-quantitatif .....	49
7	Étude de modulation de l'immunité <i>in vivo</i> .....	51
8	Statistiques .....	52
	<b>Résultats</b> .....	<b>53</b>
1	Criblage et étude comparative .....	53
1.1	Expression du gène du TNF .....	53
1.2	Sécrétion de TNF bioactif .....	53
1.3	Expression du gène de l'IL-12p40 .....	58
1.4	Sécrétion d'IL-12p40 .....	58
1.5	Expression du gène de l'IFN- $\gamma$ .....	61
1.6	Sécrétion d'IFN- $\gamma$ bioactif .....	63
1.7	Expression du gène de l'IL-4 .....	67
2	Combinaisons de bactéries .....	67

2.1	Sécrétion d'IFN- $\gamma$ bioactif . . . . .	67
3	Cytokines et souches de souris . . . . .	69
4	Expérience <i>in vivo</i> dans un modèle d'immunosuppression. . . . .	73
4.1	Essais préliminaires sur le dosage de la ConA et la cinétique . . . . .	73
4.2	Effet de bactéries administrées par gavage sur la production <i>ex vivo</i> d'IFN- $\gamma$ par des splénocytes de souris irradiées. . . . .	75
	<b>Discussion</b> . . . . .	<b>77</b>
	<b>Conclusion</b> . . . . .	<b>89</b>
	<b>Remerciements</b> . . . . .	<b>91</b>
	<b>Références bibliographiques</b> . . . . .	<b>93</b>



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

a.a.:	Acide(s) aminé(s)
ADCC:	"Antibody-dependent cellular cytotoxicity", cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ARN:	Acide ribonucléique
ConA:	Concanavaline A
CPA:	Cellule présentatrice d'antigène
CTL:	"Cytotoxic lymphocyte", cellule T cytotoxique
DEPC:	diéthyl pyrocarbonate
D.O.:	Densité optique
ELISA:	"Enzyme-linked immunosorbent assay"
GAPDH:	Glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase
GM-CSF:	"Granulocyte-macrophage colony stimulating factor", facteur stimulateur de colonies granulocytiques-macrophagiques.
Hepes:	acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique
IFN- $\gamma$ :	Interféron gamma
IL-X:	Interleukine X (où X est un nombre entier positif).
LPS:	Lipopolysaccharide
M $\Phi$ :	Macrophage
MRS:	Milieu de culture De Man-Rogosa-Sharpe
NK:	"natural killer" (tueur naturel)
PBS:	"Phosphate-buffered saline", solution saline tamponnée au phosphate
PBMC:	"Peripheral blood mononuclear cells", cellules mononucléaires du sang humain périphérique
PHA:	Phytohémagglutinine
PMA:	phorbol 12-myristate 13-acétate
PMN:	Cellule polymorphonucléée
RCM:	"Reinforced clostridial medium"
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR:	"Reverse transcription - polymerase chain reaction" (Transcription inverse - réaction de polymérase en chaîne)
STAT:	"Signal transduction and activators of transcription"

TCR:	Récepteur de cellule T
TBE:	Tris-borate-EDTA
TGF- $\beta$ :	"Transforming growth factor beta" (Facteur de transformation bêta)
Th1:	"T-helper 1" (T auxiliaire de type 1)
Th2:	"T-helper 2" (T auxiliaire de type 2)
TLR:	"Toll-Like Receptor", récepteur semblable au Toll
TNF:	"Tumor necrosis factor" (facteur nécrosant des tumeurs)

## LISTE DES TABLEAUX

1. Les espèces et souches de bactéries lactiques étudiées ainsi que leur provenance.....	9
2. Exemples d'expériences <i>in vitro</i> étudiant l'impact des bactéries lactiques sur des cellules immunocompétentes en culture. ....	30
3. Exemples d'expérience <i>in vivo</i> sur des modèles animaux chez lesquels des bactéries lactiques ont été administrées . ....	33
4. Exemples d'essais cliniques.....	37
5. Liste des amorces utilisées pour le RT-PCR. ....	50
6. Exemples de données densitométriques utilisées pour l'étude semi-quantitative d'expression de gènes de cytokines. ....	55



## LISTE DES FIGURES

1.	Monokines secrétées par le macrophage en réponse à des stimuli microbiens. ...	12
2.	Structure tridimensionnelle de la molécule du TNF, sous forme trimérique.....	13
3.	Induction et activités biologiques de l'interleukine-12.....	19
4.	Régulation croisées des profils Th1 et Th2 par les cytokines.....	21
5.	Production d'IFN- $\gamma$ en réponse à des interactions intercellulaires ou paracrines (cytokines). (Tiré de Thèze, 1999; p. 191) .....	25
6.	Modèle d'action des bactéries lactiques sur le système immunitaire mucosal et systémique, élaboré selon les connaissances actuelles. ....	40
7.	Diagramme montrant les différentes étapes du protocole in vitro de criblage des bactéries lactiques. ....	44
8.	Exemples d'électrophorèse sur gel d'agarose de produits d'amplification par PCR représentant les ARNm des gènes de la GAPDH et du TNF.....	54
9.	Expression du gène du TNF par des splénocytes de souris C57BL/6 cultivés en présence de bactéries lactiques. ....	56
10.	Sécrétion de TNF bioactif par des splénocytes cultivés en présence de bactéries lactiques. ....	57
11.	Électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR représentant le gène de la sous-unité p40 de l'interleukine-12. ....	59
12.	Expression du gène de l'IL-12 p40 par des splénocytes de souris C57BL/6 cultivés en présence de bactéries lactiques. ....	59
13.	Sécrétion d'IL-12 p40 par des splénocytes de souris C57BL/6 cultivés en présence de bactéries lactiques. ....	60

14.	Exemple d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR représentant l'ARNm de l'IFN- $\gamma$ . .....	62
15.	Expression du gène de l'IFN- $\gamma$ par des splénocytes de souris C57BL/6 cultivés en présence de bactéries lactiques. ....	62
16.	Validation du bioessai d'IFN- $\gamma$ en utilisant un anticorps neutralisant. ....	64
17.	Sécrétion d'IFN- $\gamma$ bioactif par des splénocytes cultivés en présence de bactéries lactiques. ....	65
18.	Sécrétion d'IFN- $\gamma$ bioactif par des splénocytes cultivés en présence de surnageants de cultures de bactéries lactiques. ....	66
19.	Exemple d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR représentant l'ARNm de l'IL-4. ....	68
20.	Expression du gène de l'IL-4 par des splénocytes de souris C57BL/6 cultivées en présence de bactéries lactiques. ....	68
21.	Sécrétion d'IFN- $\gamma$ bioactif par des splénocytes cultivés en présence de bactéries lactiques en combinaisons. ....	70
22.	Production d'IL-12 p40 par des splénocytes de souris en fonction de la dose de bactérie et de la souche de souris. ....	71
23.	Production d'IFN- $\gamma$ par des splénocytes de souris en fonction de la dose de bactérie et de la souche de souris. ....	72
24.	Production d'IFN- $\gamma$ bioactif par des splénocytes de souris irradiées en fonction du temps et de la dose de ConA. ....	74
25.	Production d'IFN- $\gamma$ bioactif par des splénocytes stimulés à la ConA de souris irradiées, selon le traitement administré. ....	76

## INTRODUCTION

Nous savons tous que dans la nature bien des organismes entrent en relation avec d'autres organismes, et que ces inter-relations peuvent être neutres, nuisibles, ou avantageuses pour les partenaires impliqués. Au cours, de l'évolution, certains organismes sont entrés dans une inter-relation dite de *symbiose*, qui s'avère utile et souvent essentielle pour les deux partenaires. Plusieurs exemples ont été décrits dans la nature, mais peu d'entre nous soupçonnent que l'humain lui-même participe à une forme de symbiose, cette fois avec des micro-organismes. Que ce soit sur la peau, dans la bouche ou dans l'intestin, l'être humain est l'hôte de milliards de microbes qui vivent la plupart du temps en relation paisible avec lui. Bon nombre de ces micro-organismes ont eu avantage, ne serait-ce que pour défendre leur niche écologique, à aider leur hôte à se maintenir en santé. C'est ainsi que plusieurs types de micro-organismes symbiotiques compétitionnent avec des pathogènes potentiels au niveau de l'épiderme, du vagin ou du tube digestif. De plus, des bactéries sont responsables de la synthèse de vitamines dans l'intestin, et d'autres peuvent également métaboliser des toxines et autres déchets nocifs pour l'hôte. La complexité de l'écosystème que forme la microflore intestinale est comparable à n'importe quel autre écosystème retrouvé dans la nature, et tout déséquilibre qui ferait obstacle à cette relation symbiotique deviendrait ainsi fort dommageable pour l'hôte.

Le système immunitaire est un réseau complexe de mécanismes destinés à défendre l'hôte contre l'invasion de pathogènes et à neutraliser les substances étrangères nocives. En contact permanent avec le milieu extérieur, il est en alerte perpétuelle. Une de ses tâches consiste à échantillonner constamment des produits venant du milieu intestinal, afin de déceler la présence de tout agent représentant un danger. La relation qu'entretient le système immunitaire avec la flore microbiologique est complexe et a été façonnée par des millions d'années d'évolutions parallèles. Il est généralement reconnu que la composition de la microflore influence le fonctionnement du système immunitaire. Leur défi est de définir l'impact des différentes espèces de bactéries présentes, ou de leurs sous-produits, sur la réponse immunitaire. Une meilleure compréhension de ces phénomènes nous permettrait de concevoir des aliments ou des suppléments alimentaires contenant des

micro-organismes sélectionnés pour leur propriétés immuno-modulatrices. Ces aliments fonctionnels pourraient être consommés pour assurer une résistance à l'infection, pour prévenir des allergies, pour activer l'immunité dans des cas de maladies ou d'immunodépression, ou au contraire pour freiner la progression de maladies auto-immunes.

Dans l'optique d'une recherche plus approfondie sur les effets immunomodulateurs des bactéries lactiques, il est important de savoir ce qui rend un type de bactérie plus apte qu'un autre à moduler un ou plusieurs paramètres de l'immunité. Peu de travaux se sont penchés sur l'étude d'une série variée et représentative de souches ou d'espèces de bactéries, afin de les comparer sur une même base, de façon parallèle, quant à leur action sur un même ensemble de paramètres immunitaires.

Nous entendons répondre à ce besoin en comparant neuf souches ou espèces de bactéries lactiques selon leur capacité à moduler l'expression de cytokines caractéristiques (TNF, IFN- $\gamma$ , IL-12 et IL-4) dans un modèle murin *in vitro* quantifiable et reproductible.

En plus de la grande variété de type des bactéries lactiques pouvant être étudiée, plusieurs combinaisons de ces bactéries pourraient être administrées et provoquer des effets différents de ce qu'on obtient avec des souches seules (synergie, inhibition, etc.). Notre second objectif sera donc de mesurer la modulation de la production d'IFN- $\gamma$  par différentes combinaisons de bactéries lactiques.

Comme nous le verrons dans la revue bibliographique, l'étude de la modulation de l'immunité *in vivo* passe par la conception d'un modèle de pathologie. La résistance à la maladie ou la vitesse de récupération seraient modulées par l'administration de bactéries lactiques. En sachant que ce serait fort probablement chez des souris immunodéprimées, donc sensibles, que nous serions le plus en mesure de déceler une quelconque modulation, nous avons établi comme troisième objectif d'étudier *in vivo* la capacité de souris irradiées et gavées avec des bactéries lactiques sélectionnées à sécréter de l'IFN- $\gamma$ .

La première section est consacrée à une revue des différents sujets reliés aux phénomènes décrits dans ces pages. Elles comprend trois parties, la première traitant des bactéries lactiques, la seconde du système immunitaire et des cytokines, et la troisième répertoriant les effets *in vivo* et *in vitro* connus découlant des relations bactéries lactiques-système immunitaire.

La seconde section contient les protocoles expérimentaux utilisés pour rencontrer les objectifs énumérés ci-haut. Les matériels et techniques y sont décrits en détails.

La troisième section regroupe les résultats des expériences, principalement présentés sous forme de graphiques. Un texte explicatif accompagne ces données.

La quatrième section constitue une tentative d'interpréter les résultats obtenus, pour les mettre en relation avec les connaissances actuelles et discuter des perspectives futures dans le domaine.



# CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1 Historique

C'est en 1885 que Louis Pasteur proposa pour la première fois que le système immunitaire pouvait être influencé par des micro-organismes. Par ses nombreux travaux sur la fermentation et sur l'immunisation, il nous fit prendre conscience du rôle de premier plan que jouent les micro-organismes dans notre vie. Un contemporain de Pasteur, Elie Metchnikoff décrivit pour la première fois le phénomène de la phagocytose, ce qui fit de lui un des pères de l'immunité cellulaire et de l'immunologie moderne, et lui valu en 1908 le prix Nobel de médecine avec Paul Ehrlich. Plusieurs des travaux de Metchnikoff l'ont amené à étudier la relation entre les bactéries lactiques et le corps humain. Il remarqua entre autre que les habitants de la Bulgarie, de grands consommateurs de yogourt, vivaient plus longtemps que la moyenne, malgré des conditions de vie difficiles. Il postula que les conditions débilitantes de la vieillesse pouvaient être causées par les bactéries *putréfiantes* du côlon, et que l'ingestion de lactobacilles dans le yogourt pourrait remplacer ces bacilles nuisibles et ainsi prolonger la vie de l'individu (Metchnikoff, 1907).

Cette théorie, bien que paraissant simpliste à nos yeux, était valable, comme en ont témoigné les découvertes faites dans les années ultérieures, qui lui ont donné partiellement raison. Les premiers résultats montrèrent que le yogourt, un aliment fermenté contenant des bactéries actives, peut prévenir ou soulager certains types de diarrhée et autres malaises intestinaux. Il fut également démontré que les bactéries lactiques aident à digérer le lactose du lait et peuvent donc réduire l'intolérance au lactose (phénomène dû à une déficience en lactase). Les bactéries lactiques sont maintenant couramment utilisées pour soulager les désordres intestinaux causés par des thérapies prolongées aux antibiotiques, qui perturbent la flore intestinale.

Les aliments fermentés pourraient également prévenir l'invasion de pathogènes intestinaux comme *Salmonella spp.* ou la *E. coli* entéropathogénique. Elle peuvent exercer cette action soit passivement en compétitionnant pour les nutriments avec les microbes indésirables, soit activement en produisant des composés antimicrobiens ou en stimulant

le système immunitaire. La protection contre les pathogènes vaginaux opportunistes tels que *Candida albicans* par des lactobacilles est un bon exemple de défense passive par la microflore commensale. Les lactobacilles produisent de l'acide lactique qui baisse le pH et rend l'environnement hostile à la colonisation par d'autres micro-organismes.

De nombreuses autres propriétés ont été attribuées aux bactéries lactiques. Parmi celles-ci, le renforcement des défenses de l'hôte occupe une place de choix. Une quantité impressionnante de résultats d'études faites en laboratoire ou dans la population ont démontré une action bénéfique de ces bactéries sur le système immunitaire. La nature de la bactérie étudiée, ainsi que la forme de réaction immunitaire caractérisée, varient grandement. Il est donc important, avant de continuer, de définir plus en détail les caractéristiques des bactéries lactiques, de même que les principaux mécanismes de régulation de la réponse immunitaire.

## **2 Les bactéries lactiques**

### **2.1 Définitions**

Les bactéries lactiques sont des bactéries microaérophiles formant un vaste groupe hétérogène de bactéries ayant certains points en commun. On les retrouve dans la nature là où il y a peu d'oxygène mais beaucoup de nutriments énergétiques comme des glucides ou des protides. Des bactéries lactiques sont présentes dans le sol, les produits laitiers, les végétaux, la viande et dans certains sites anatomiques chez les animaux incluant l'être humain, chez qui elles ne causent aucune maladie connue. Ce sont à la base des bactéries Gram positives qui fermentent le lactose et d'autres sucres et produisent de l'acide lactique (Saloff-Coste, 1999). Elles ne sont pas dotées d'un système oxydoréductif à chaînes d'électrons propre aux aérobies qui leur permettrait de brûler entièrement les glucides, avec seulement de l'eau et du CO<sub>2</sub> comme produits finaux. Plusieurs de ces organismes sont utilisés dans l'industrie alimentaire pour produire des aliments fermentés. À l'intérieur de cette superfamille, on trouve les bactéries probiotiques, qui bénéficient d'un statut particulier.

La définition d'un probiotique tel que donné par Fuller (1989) est celle d'un *supplément alimentaire microbien qui a un effet bénéfique sur l'hôte en améliorant la qualité de sa microflore intestinale* (traduction libre). Cette description fut perçue par plusieurs scientifiques comme laissant place à une trop large interprétation et à une utilisation abusive du terme. En 1998, un consortium de chercheurs, de cliniciens et d'industriels en sont venus à un consensus sur ce que devrait être un probiotique humain. *N'est pas probiotique qui veut...*

**Pour être qualifié de probiotique, un micro-organisme doit:**

- Être d'origine humaine.
- Ne pas démontrer de comportement pathogénique.
- Afficher une résistance aux procédés technologiques (i.e. être viable et actif dans le produit offert).
- Adhérer à l'épithélium intestinal.
- Pouvoir persister, ne serait-ce que brièvement, dans le tube digestif.
- Produire des substances antimicrobiennes.
- Moduler les réponses immunitaires.
- Être capable d'influencer les activités métaboliques (ex: assimilation du cholestérol, activité lactase, production de vitamine).
- Être testé et documenté individuellement, jusqu'au niveau de la souche étudiée.
- Les tests cliniques doivent être adéquatement contrôlés tant au niveau des produits testés que de la population ciblée, et les résultats doivent être publiés et reproduits par des groupes indépendants. (Source: Dunne *et al.*, 1999)

Ces critères sont très restrictifs et représentent somme toute ce que devrait être un bon probiotique. Elles sont toutefois essentielles pour supporter toute allégation d'effets thérapeutiques scientifiquement valides. Évidemment, faute de données solides, plusieurs bactéries à usage "thérapeutique" ne peuvent pas encore rencontrer ces exigences.

## **2.2 Physiologie des bactéries lactiques**

Il existe une variété de bactéries lactiques. De nombreux tests biochimiques ou génétiques ont été effectués afin de différencier les différentes espèces et les classer dans des groupes ou familles selon un ordre hiérarchique. Les bactéries lactiques qui sont utilisées dans ce projet sont du genre *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Bifidobacterium*. Le tableau I énumère les différentes espèces et souches étudiées, ainsi que leur provenance.

Les propriétés des cellules bactériennes varient selon l'espèce ou la souche ainsi que selon les conditions de culture. Certaines bactéries vont exprimer des gènes de stress dans la phase stationnaire de croissance, ce qui leur permettra de survivre en empruntant des voies métaboliques secondaires. D'autres souches appelées mucoïdes vont produire, dans les conditions appropriées, des polysaccharides extracellulaires ou *exopolysaccharides*. Les espèces *L. bulgaricus* et *S. thermophilus*, qui sont utilisées dans la fermentation du yogourt ont une relation symbiotique dite de protocoopération, qui leur est mutuellement bénéfique. *L. bulgaricus* est très protéolytique et fournit des petits peptides à *S. thermophilus*. Ce dernier de son côté produit de l'acide formique et du dioxyde de carbone qui sont utilisés par *L. bulgaricus* pour la synthèse de métabolites (Hartley et Denariáz, 1993). Lorsqu'elles sont cultivées ensemble, ces deux bactéries ont une phase de latence plus courte et une croissance plus rapide que lorsqu'elles sont cultivées séparément.

Les **lactobacilles** sont des bactéries Gram positives en forme de bâtonnet. Elles sont microaérophiles et thermophiles, avec une température de croissance optimale à 44°C. Les membres de la famille Acidophilus (i.e. *L. acidophilus* et *L. johnsonii*) sont homofermentatifs et ne produisent que de l'acide lactique par fermentation des sucres. Les membres de la famille Casei (*L. paracasei*, *L. rhamnosus*) sont hétérofermentatifs et peuvent produire de l'acide lactique et de l'éthanol s'ils sont privés de glucose (Hartley et Denariáz, 1993).

*Streptococcus thermophilus* est un cocci Gram positif, anaérobe facultatif. Il pousse à une température optimale de 40°C et est homofermenteur, transformant les hexoses en L-acide lactique (Hartley et Denariáz, 1993).

Les **bifidobactéries** sont des bâtonnets Gram positifs qui apparaissent sous la caractéristique forme *bifide* – en forme de y – dans certaines conditions de culture. Elles sont strictement anaérobiques, quoique la résistance à l'oxygène varie selon les espèces (Hartley et Denariáz, 1993). Elles sont hétérofermentatives, formant de l'acide lactique et acétique par fermentation des hexoses. Elles ont une courbe de croissance optimale entre 37°C et 43°C. Cette croissance est plus lente que celle des autres bactéries lactiques. Leur

besoins complexes en nutriments et leur croissance en anaérobiose stricte en font des bactéries difficiles à cultiver. Les bifidobactéries composent une bonne partie de la flore du côlon et sont les premières à apparaître chez un enfant nourri au lait maternel (Tissier, 1906). Le tableau I énumère les bactéries que nous avons étudiées dans ce travail, ainsi que leur provenance.

Nom	Abréviation	Provenance	Synonymes	Probiotique?
<i>Lactobacillus paracasei</i> C1	LC	CRDA	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	Oui
<i>L. acidophilus</i> 4356	LA 4356	ATCC		Oui
<i>L. rhamnosus</i> 53103	LR 53103	ATCC	<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. casei</i> GG, <i>Lactobacillus</i> GG	Oui
<i>L. johnsonii</i> C4	LJ	CRDA		Oui
<i>L. lactis</i> R187	LL	Institut Rosell	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	Non
<i>Streptococcus thermophilus</i> R083	ST	Institut Rosell	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	Non
<i>L. rhamnosus</i> R011	LR 011	Institut Rosell	<i>L. casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>	Oui
<i>L. acidophilus</i> R052	LA R052	Institut Rosell		Oui
<i>Bifidobacterium longum</i> R175	BL	Institut Rosell		Oui

**Tableau I:** Les espèces et souches de bactéries lactiques étudiées ainsi que leur provenance.  
ATCC: American Type Culture Collection. CRDA: Centre de Recherche et de Développement sur les Aliments

### 3 Les cytokines et le système immunitaire

On appelle cytokines des molécules peptidiques agissant sur les cellules environnantes et ayant pour effet de modifier la nature ou l'intensité d'une réponse immunitaire. Toutes les cellules du système immunitaire ainsi que d'autres types de cellule répondent à au moins une cytokine et la plupart peuvent en sécréter. Les effets des cytokines sont très diversifiés: différenciation, prolifération, migration, activation, inhibition ou mort. Certaines cytokines ont des actions différentes selon le type de cellule, le type de récepteur ou l'état d'activation de la cellule réceptrice. Bref, les cytokines forment un réseau de communication infiniment complexe qui sert à contrôler et à coordonner avec une grande précision les défenses de l'organisme.

La sécrétion de cytokines est déclenchée en réponse à des stimuli divers: reconnaissance de parasites extracellulaires ou intracellulaires, reconnaissance d'une tumeur, d'une toxine, dommage tissulaire, ou simplement réponse à une autre cytokine. En général, les réponses se soldant par la production de cytokines peuvent être grossièrement classées en deux catégories: non-adaptative ou précoce, et adaptative ou tardive.

#### 3.1 La réponse non-adaptative et l'inflammation

Ce type de réponse est propre aux premières lignes de défenses de l'organisme contre les dommages tissulaires dus à des agents chimiques, physiques ou biologiques. Les macrophages sont les chefs d'orchestres de la réponse immédiate ou précoce, jouant à la fois un rôle d'effecteurs en phagocytant les microbes et un rôle d'activateur en sécrétant bon nombre de cytokines regroupées sous le terme *monokines* (voir la figure 1). L'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, le TNF- $\alpha$  et l'IL-12 sont les principales monokines. Elles jouent un rôle primordial dans le contrôle des premières étapes de la réponse immunitaire, et dans l'orientation des étapes subséquentes.

Le macrophage possède un certain nombre de récepteurs à sa surface dont la fonction est de se lier à des composantes invariables des bactéries et d'autres parasites. Ces récepteurs sont apparus au cours de l'évolution afin de permettre aux défenses de l'hôte de détecter la présence de microbes pathogènes, quels qu'ils soient. Les molécules CD14

sont des récepteurs se liant au LPS (lipopolysaccharide) présent à la surface des bactéries gram négatives (Couturier *et al.*, 1991); ces récepteurs envoient un signal d'activation à la cellule via des molécules accessoires. Les récepteurs Toll (TLR) se lient à des motifs conservés sur les membranes bactériennes, tels des lipoprotéines (Brightbill *et al.*, 1999); les récepteurs du mannose se lient à des groupes de mannoses sur les bactéries. De plus, les récepteurs CR1, CR3 et CR4 reconnaissent les molécules C3b ou iC3b, des composantes de la cascade du complément présentes à la surface de bactéries opsonisées.

Toutes ces interactions récepteur-ligand ont pour effet d'activer le macrophage, d'amorcer la flambée oxidative, de déclencher la phagocytose et de libérer des médiateurs chimiques agissant comme des signaux d'alarme pour les cellules environnantes. La sécrétion de monokines, de chimiokines<sup>1</sup> et d'oxyde nitrique (NO) a pour effet d'attirer d'autres cellules immunitaires sur le site et de faciliter leur migration en augmentant la perméabilité vasculaire. Arrivées sur le site, ces cellules peuvent être activées par les mêmes cytokines, afin de pouvoir exercer leurs fonctions.

Parmi les cytokines précoces pro-inflammatoires et inflammatoires, le TNF- $\alpha$  et l'IL-12 nous intéressent tout particulièrement. Leur expression génique et leur sécrétion seront quantifiées dans le projet de recherche présenté dans ce mémoire. Il est donc tout indiqué de décrire plus en détails les propriétés biochimiques et physiologiques de chacune.

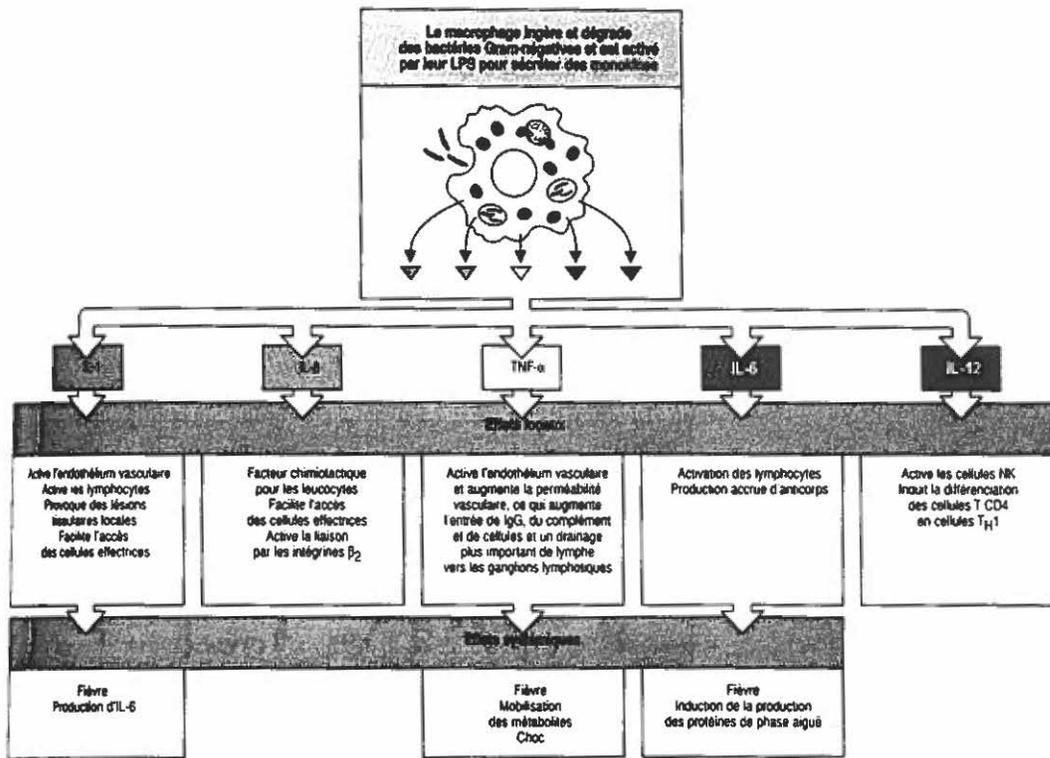
## 3.2 Facteur nécrosant des tumeurs (TNF)

### 3.2.1 Structure

Le TNF est le premier membre d'une famille de ligands et de récepteurs: la famille du TNF et la famille du récepteur du TNF (TNFR). Les membres de ces familles ont des structures semblables et des activités biologiques similaires, toutes orientées vers la modulation de l'immunité, la différenciation ou la mort cellulaire. Un grand nombre de membres ont été répertoriés, dont TNF- $\alpha$ , LT $\alpha$  et LT $\beta$  (LT : lymphotoxine), CD95L

---

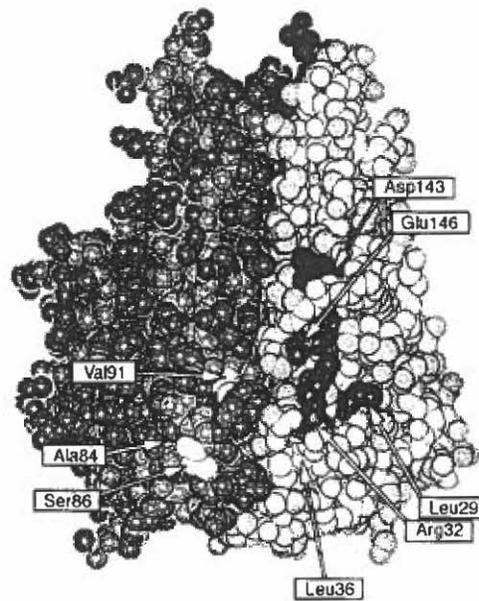
1. Les chimiokines forment une sous-famille de cytokines ayant une structure similaire et dont l'effet biologique est d'attirer par chimiotactisme les cellules cibles vers un site d'inflammation. L'IL-8, RANTES et le MCP sont des chimiokines.



**Figure 1:** Monokines sécrétées par le macrophage en réponse à des stimuli microbiens. Les effets inflammatoires locaux et systémiques attribuables à chaque cytokine sont énumérés dans les boîtes. (Tiré de Janeway et Travers, 1996; p. 9:13)

(FasL), CD40L, NGF (*nerve growth factor*), TRAIL et leurs récepteurs correspondants. Le TNF- $\alpha$  et le LT $\alpha$  se lient aux mêmes récepteurs, c'est pourquoi LT était autrefois connu sous le nom de TNF- $\beta$ . À moins d'indications contraires, le terme "TNF" sera utilisé pour désigner le TNF- $\alpha$ , et c'est sur cette molécule que nous nous attarderons.

La molécule du TNF tel qu'illustrée dans la figure 2, se trouve à l'état mature sous forme d'homotrimer d'unités de 26 kDa composées de 183 acides aminés chacune (Thèze, 1999). Cette protéine est initialement synthétisée sous forme de précurseur de 233 acides aminés, qui est clivé à l'extrémité N-terminale. La molécule du TNF est exprimée sous forme de protéine transmembranaire de type II, avec le domaine extracellulaire contenant la partie C-terminale. La forme membranaire peut être clivée par une enzyme nommée TACE (pour *TNF-alpha converting enzyme*) et donner la forme soluble de 157 acides aminés et de 17,5 kDa, toujours sous forme trimérique (Thèze, 1999). Chaque sous-unité peut se lier à un site sur le récepteur, permettant une oligomérisation des récepteurs à



**Figure 2:** Structure tridimensionnelle de la molécule du TNF, sous forme trimérique. (Tiré de Thèze, 1999; p. 63).

la surface de la cellule cible (Thèze, 1999). Il est généralement d'avis que ce phénomène compte pour beaucoup dans l'amplification du signal et dans sa transduction.

### 3.2.2 Récepteurs du TNF

Il existe deux sortes de récepteurs auxquels se lie le TNF: le récepteur de type I (TNF-R1 ou CD120a) et le récepteur de type II (TNF-R2 ou CD120b). Le CD120a est un récepteur exprimé à la surface de presque tous les types de cellules. On lui concède les actions biologiques principales exercées par TNF sur ses cellules cibles (Thèze, 1999). Les travaux se sont principalement penchés sur CD120a jusqu'à maintenant. L'expression du CD120b est davantage restreinte: on le trouve à la surface de cellules hématopoïétiques comme les lymphocytes et les phagocytes mononucléaires. Le CD120b a une plus haute affinité pour le TNF que le CD120a, surtout pour sa forme membranaire (Tartaglia et Goeddel, 1992). Certains chercheurs ont suggéré que le CD120b jouerait son rôle sous l'effet de faibles concentrations de TNF alors que CD120a agirait à plus haute concentration de ligand (Tartaglia et Goeddel, 1992).

Les deux récepteurs transmettent leur signal lorsque pontés par leur ligand, ce qui entraîne leur agrégation à la surface de la cellule. La partie intracellulaire du CD120a contient des motifs de mort (death domains) qui se lient à des protéines adaptatrices (TRADD, FADD/MORT1, RIP, etc.) qui sont impliquées dans la cytotoxicité et la mort cellulaire programmée (apoptose). Le CD120b quant à lui est associé dans sa portion cytoplasmique à des molécules TRAF (pour *TNF-receptor associated factor*) qui participent à une cascade de signalisation menant à l'activation du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B et à sa translocation dans le noyau. NF- $\kappa$ B est un facteur important dans l'activation cellulaire lors de réponses immunitaires car il contribue à l'activation de la transcription de gènes de cytokines et d'autres effecteurs immunitaires, en plus d'avoir un effet anti-apoptotique.

Des formes solubles de CD120a et CD120b ont été identifiées et isolées dans l'urine et dans le sérum (Seckinger *et al.*, 1990; Kohno *et al.*, 1990) et dans d'autres fluides corporels de personnes malades et en santé. Même si leur rôle est encore mal compris, nous savons que ces molécules proviennent du clivage de récepteurs par des métalloprotéinases. Elles peuvent à la fois inhiber l'action du TNF en compétitionnant avec les récepteurs actifs, et prolonger son action dans le temps en stabilisant la forme trimérique et en agissant comme réservoir naturel (Olsson *et al.*, 1996).

### 3.2.3 Induction et production

Le TNF peut être produit par plusieurs types de cellules, en réponse à des stimuli variés. Les producteurs principaux de TNF sont les phagocytes mononucléaires activés, les lymphocytes T et les lymphocytes B sous certaines conditions (Nedwin *et al.*, 1985). Les lymphocytes T auxiliaires CD4<sup>+</sup> inflammatoires de type Th1 sont également d'importants producteurs de TNF, qui rappelons-le se lie aux récepteurs du TNF. Les cellules Th1 seront définies dans la section 3.4. D'autres cellules, telles les fibroblastes, les kératinocytes, les mastocytes, les cellules musculaires et les astrocytes peuvent également sécréter du TNF en petites quantités.

L'induction de la production du TNF est hautement stimulus-dépendante. Les phagocytes produisent de grandes quantités de TNF en réponse à des composantes

microbiennes (LPS, ARN double-brin, composantes de parois bactériennes, etc.). Le TNF est également induit par la présence d'autres cytokines comme l'IL-1 $\beta$  et le GM-CSF, et par lui-même.

La régulation de la production du TNF s'opère à plusieurs niveaux. La transcription du gène du TNF responsable de la production d'ARNm est sous contrôle des différents facteurs de transcription. Au niveau post-transcriptionnel, la stabilité de l'ARNm et par sa traduction en polypeptide est également régulée (Sariban *et al.*, 1988). De plus, la sécrétion peut être modulée rapidement grâce à l'emmagasinage de TNF actif dans des vésicules intracellulaires (Steffen *et al.*, 1989). L'activation de la transcription du gène du TNF est rapide; elle peut être observée deux heures après stimulation et se maintient pendant 8 à 12 heures.

#### **3.2.4 Effets biologiques**

Le TNF est une des cytokines ayant le plus large spectre d'activité. Des dizaines d'effets ont été répertoriés tant au niveau cellulaire qu'au niveau de l'organisme. Tous les types de cellules sont sensibles à l'action du TNF.

L'action immunomodulatrice du TNF est primordiale dans le contrôle de l'infection. Lorsque le TNF est neutralisé par un anticorps, l'animal est incapable de contrôler une infection bactérienne locale, qui finit par se disséminer à d'autres organes. Au niveau local, le TNF active la coagulation par l'activation du facteur activateur de plaquettes (PAF), provoque la destruction de la matrice extracellulaire et la mort de cellules malades, et stimule la production de facteurs chimiotactiques et vasoactifs comme les prostaglandines et les leucotriènes. Le TNF peut stimuler la production d'autres cytokines comme l'IL-1 et l'IL-6 (Vassalli, 1992), et inhibe l'apoptose chez les monocytes/macrophages (Mangan *et al.*, 1991). Tous ces effets ont pour but de circonscire l'infection au site primaire et d'activer les défenses appropriées. En stimulant la prolifération de fibroblastes sains, le TNF assure également la réparation de la lésion.

Bien que principalement locale, l'action du TNF peut s'étendre à l'organisme entier. Il peut agir sur le cerveau et provoquer les symptômes associés à une maladie infectieuse

comme la fièvre, la perte d'appétit et la fatigue chronique. Il agit directement ou indirectement (par l'induction de l'IL-1 et de l'IL-6) chez les hépatocytes du foie sur la biosynthèse des protéines de phase aiguës (Mortensen *et al.*, 1998; Andus *et al.*, 1988). Si ce phénomène s'intensifie et que l'infection se généralise, la production TNF peut avoir de graves conséquences pour l'organisme. Une immunopathologie souvent fatale connue sous le terme de *septicémie* ou *choc septique* est directement liée à la présence de niveaux anormalement hauts de TNF dans le sérum (Tracey *et al.*, 1987). Des anticorps monoclonaux neutralisant le TNF et donnés *in vivo* préviennent le choc septique (Shimamoto *et al.*, 1988). Le TNF n'est toutefois pas l'unique agent en cause dans le phénomène complexe du choc septique.

Le TNF, présent à la surface des lymphocytes Th1 ou en solution dans le milieu, active chez le macrophage la production de dérivés oxydatifs et azotés et agit en synergie avec l'IFN- $\gamma$  pour permettre la destruction de parasites intracellulaires (Champsi *et al.*, 1994, 1998). Il est également un stimulateur de la phagocytose. Toujours en synergie avec l'IFN- $\gamma$ , il module à la hausse l'expression de molécules du CMH de classe II et de molécules de co-stimulation dans les cellules présentatrices d'antigène. Son activité directement cytotoxique sur bon nombre de cellules lui confère un rôle antiviral et antitumoral propre. Le terme TNF vient d'ailleurs de son aptitude à détruire la vascularisation de tumeurs solides, entraînant leur mort par nécrose (Carswell *et al.*, 1975).

Enfin, il a été démontré que le TNF est important lors de l'embryogénèse (Gendron *et al.*, 1991) et lors de la maturation des cellules souches en cellules dendritiques ou en macrophages (Caux *et al.*, 1992).

### **3.3 Interleukine-12**

#### **3.3.1 Structure**

La molécule soluble d'IL-12 est en fait un hétérodimère formé d'une chaîne lourde de 40 kDa (IL-12 p40) et d'une chaîne légère de 35 kDa (IL-12 p35). Ces deux chaînes sont codées par des gènes indépendants et sont reliées par un pont disulfure pour donner la

forme bioactive de 70 kDA (IL-12 p70) (Wolf *et al.*, 1991). L'IL-12 p35 démontre une homologie avec l'IL-6 alors que la p40 est semblable aux récepteurs de l'IL-6 et du CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) (Merberg *et al.*, 1992). Le gène de la p35 est constitutivement actif mais peut être modulé à la hausse. Le gène codant pour la p40 est fortement inductible chez les phagocytes. Des chaînes d'IL-12 p40 sous forme de monomères ou d'homodimères sont présentes en excès dans le milieu par rapport à la p70, mais n'ont aucune activité biologique propre (Cassatella *et al.*, 1995). On soupçonne que la forme homodimérique de p40 serait un antagoniste compétitif de l'IL-12 bioactif à la fois *in vivo* et *in vitro* avec une action anti-inflammatoire (Ling *et al.*, 1995; Gately *et al.*, 1996; Heinzl *et al.*, 1997). Cependant, on en sait encore peu sur son degré de production *in vivo* lors de réponses immunitaires. La chaîne p35 libre n'est pas détectable en dehors de la cellule (Cassatella *et al.*, 1995).

### 3.3.2 Récepteur de l'IL-12

Le récepteur de l'IL-12 est composé lui aussi de deux sous-unités codées par des gènes distincts : IL-12R $\beta$ 1 et IL-12R $\beta$ 2. L'unité  $\beta$ 2 n'est pas nécessaire pour l'expression du récepteur à la surface de la cellule mais sa présence augmente grandement l'affinité du récepteur pour son ligand (Presky *et al.*, 1995). De plus, la queue cytoplasmique de l'IL-12R $\beta$ 2 contient trois tyrosines impliquées dans la signalisation. La portion p40 de l'IL-12 se lie à l'IL-12R $\beta$ 1; la p40 et la p35 participent au contact avec la moitié  $\beta$ 2 du récepteur (Presky *et al.*, 1995). Cette dernière est un important facteur restrictif de la réponse à l'IL-12. Sa coexpression sur la membrane augmente grandement la réponse à l'IL-12. La présence d'interféron alpha chez l'Humain et gamma chez la Souris (Wu *et al.*, 2000), de même que l'IL-2 (Wang *et al.*, 2000) et l'IL-18 (Chang *et al.*, 2000) module à la hausse l'expression de l'IL-12R $\beta$ 2 chez les lymphocytes T et les cellules NK, augmentant leur sensibilité à l'IL-12. Ce récepteur est également induit par l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  lors de la différenciation des cellules T naïves, menant à leur différenciation en cellules Th1 (Rogge *et al.*, 1997). Le gène de l'IL-12R $\beta$ 2 est réprimé chez les lymphocytes Th2, les rendant insensibles à l'action de l'IL-12 (Szabo *et al.*, 1995). La signalisation par l'IL-12R passe par la cascade des Jak/STAT. Jak2 et Tyk2, ainsi que STAT3 et STAT4 sont impliqués dans la transduction intracellulaire du signal vers le noyau (Zou *et al.*, 1997).

### 3.3.3 Induction et production

Les cellules formant la première ligne de défense contre les agents infectieux, c'est à dire les monocytes/macrophages, les cellules polymorphonucléées (PMN) et les cellules dendritiques, sont les principales sources d'IL-12. La figure 3 illustre les différentes cellules produisant de l'IL-12 en réponse à des stimuli variés. Les cellules phagocytaires produisent de l'IL-12 en réponse à des micro-organismes (*S. aureus*, *M. tuberculosis*, *Toxoplasma*) ou à leurs composantes (LPS, peptidoglycane, ADN bactérien, etc.) (Chehimi et Trinchieri, 1994). Chez ces cellules, l'IFN- $\gamma$  a un effet amplificateur important sur la sécrétion d'IL-12. Puisque l'IL-12 est elle-même stimulatrice de la production d'IFN- $\gamma$  chez les lymphocytes Th1 et les NK, ce phénomène représente une boucle de rétroaction positive contribuant au maintien d'une réaction de type Th1 (Chehimi et Trinchieri, 1994). Deux mécanismes distincts expliquant l'induction de l'IL-12 par des micro-organismes ont été révélés chez le macrophage: la phagocytose opérée par le récepteur du mannose, et l'activation via les récepteurs du LPS et de l'IFN- $\gamma$  (Shibata *et al.*, 1997).

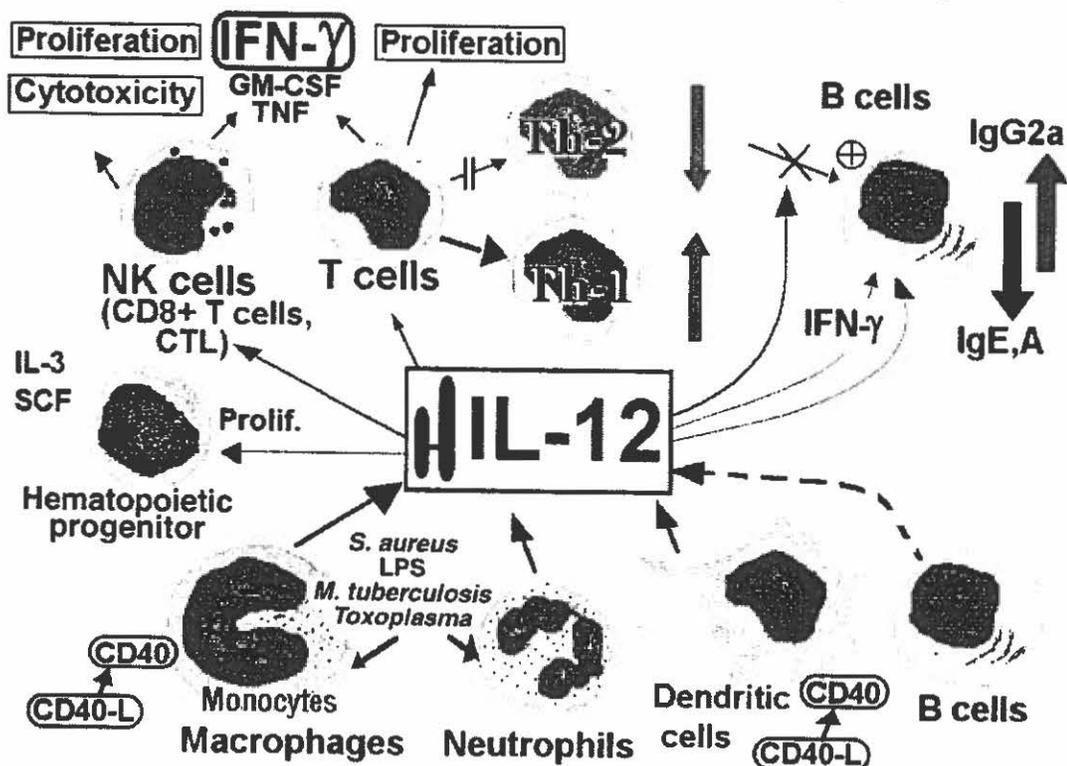
Les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques et macrophages) sont également des sources non négligeables d'IL-12. Cette production est enclenchée lorsque des cellules Th1 reconnaissent un antigène sur une CPA dans le contexte d'une molécule de CMH, par le biais de leur TCR. L'interaction qui s'ensuit entre les molécules CD40L sur la cellule T et CD40 sur la CPA signale à cette dernière de produire de l'IL-12 (Cella *et al.*, 1996). Cette voie d'activation se distingue donc de la voie plus directe et précoce empruntée par les phagocytes et représente un mécanisme immun assurant une réponse de type Th1 à un antigène de rappel.

### 3.3.4 Effets biologiques

De nombreux effets de l'IL-12 ont été répertoriés, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Tous ces effets ont en commun un seul but: la stimulation de l'immunité cellulaire. La figure 3 illustre l'impact qu'a la présence de l'IL-12 sur plusieurs types de cellules. L'IL-12 module l'action des effecteurs de l'immunité adaptative et est donc perçue comme le lien entre les réactions de type innée et celles de type spécifique. L'IL-12 induit les cellules T (CD4+ et

CD8+) et les cellules NK à produire de l'IFN- $\gamma$ , la cytokine principale du profil Th1 (Trinchieri, 1994). La présence d'IL-18, d'IL-1 ou de TNF renforcent l'action pro-IFN- $\gamma$  de l'IL-12 (Tominaga *et al.*, 2000). L'IFN- $\gamma$  peut à son tour activer les macrophages et augmenter leur production d'IL-12. Au niveau de la CPA, il y a synergie entre l'IL-12 et les molécules co-stimulatrices B7/CD28 pour l'induction de la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T (Kubin *et al.*, 1994). L'IL-12 favorise la génération de cellules T auxiliaires de type 1 et de cellules T cytotoxiques lors d'une réaction immunitaire (Trinchieri, 1994). L'IL-12 induit la prolifération de cellules T tueuses (CTL) ou NK activées (LAK) et augmente leur pouvoir cytotoxique (Trinchieri, 1994).

Le développement de cellules de type Th1 requiert l'action de l'IL-12. Nous parlerons plus en détail de l'équilibre entre les profils Th1 et Th2 lors d'une infection, dans les sections qui suivent.



**Figure 3:** Induction et activités biologiques de l'interleukine-12.  
(Tiré de Thèse, 1999; p. 99)

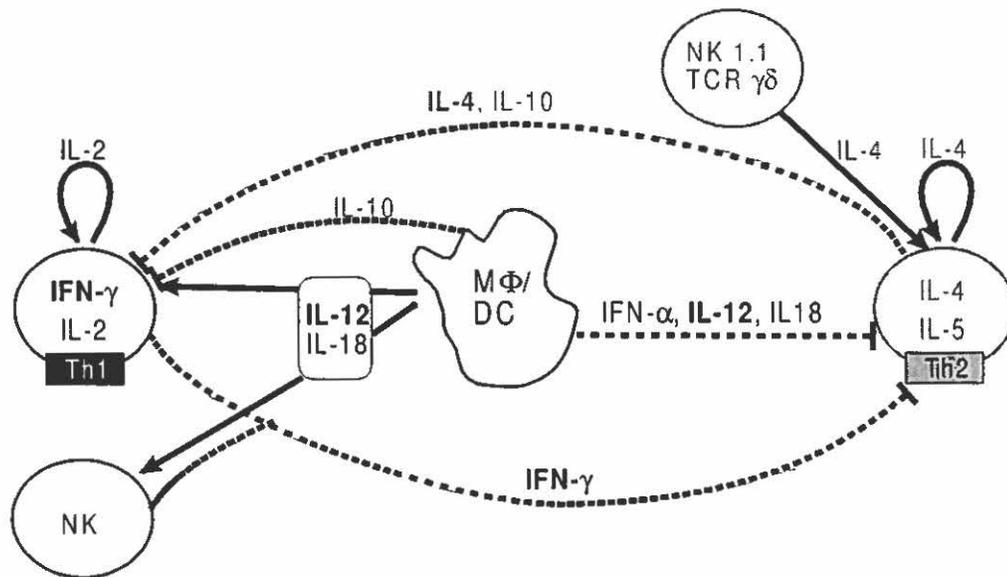
### 3.4 La réponse adaptative

#### 3.4.1 Th1 versus Th2

La réponse immunitaire de type adaptatif, qui met en jeu des récepteurs et des anticorps spécifiques aux antigènes, est contrôlée principalement par une classe de cellules: les lymphocytes T auxiliaires CD4<sup>+</sup> (Th). Ceux-ci sont en quelque sorte les chefs d'orchestre dirigeant grâce à la production de cytokines les effecteurs de l'immunité que sont les CTLs, les cellules B, les macrophages, les granulocytes et les cellules NK. Il a été découvert chez la Souris, et ensuite chez l'Humain, que la sécrétion de cytokines par les cellules Th activées peut être divisée en deux profils mutuellement exclusifs : Th1 et Th2. Une troisième sous-population, les Th0, sécréterait un mélange des deux et représenterait un point de départ non différencié. Le schéma de la figure 4 illustre la régulation croisée des fonctions auxiliaires par les cytokines.

Comme mentionné précédemment, les cellules Th1 se développent lorsque des lymphocytes T naïfs sont activés en présence de l'IL-12 provenant de macrophages ou de CPA. Les Th1 sécrètent de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-2 et du TNF- $\beta$  et peuvent induire une réponse inflammatoire tel que l'hypersensibilité retardée (*delayed-type hypersensitivity, DTH*). Ils sont spécifiquement inhibés par l'IL-4 et l'IL-10. Leur rôle *in vivo* serait d'activer les défenses contre les parasites intracellulaires, de promouvoir l'action microbicide des macrophages et la production d'anticorps opsonisants fixant le complément. La promotion de l'immunité cellulaire par les Th1 protégerait entre autre contre des maladies causées par *Mycobacterium, Listeria, Toxoplasma, Leishmania*, des virus et des tumeurs.

Les cellules Th2 sont générées pour leur part sous l'effet de l'IL-4. Cette cytokines peut provenir de mastocytes, de cellules spéciales TCR $\gamma\delta^+$  ou "NK-T", ou d'autres lymphocytes Th2. Ceux-ci sécrètent eux-mêmes de l'IL-4, de l'IL-13, de l'IL-5 et de l'IL-6 lorsqu'ils sont activés. L'IFN- $\gamma$  inhibe spécifiquement l'activité Th2. *In vivo*, ces cytokines vont stimuler une réponse humorale en induisant la croissance et la différenciation des cellules B en cellules productrices d'anticorps, principalement IgG4 et IgE. L'IL-5 attire les éosinophiles et induit leur différenciation. La réponse Th2 serait donc importante pour



**Figure 4:** Régulation croisées des profils Th1 et Th2 par les cytokines

Les flèches représentent des actions inductrices, les lignes pointillées représentent des actions inhibitrices. (Adapté de Thèse, 1999; p. 223)

se débarrasser de parasites extracellulaires tels les helminthes et serait impliquée dans les allergies.

La décision de s'orienter vers un profil Th1 ou Th2 dépend de plusieurs facteurs. La présence de cytokines environnantes joue un rôle primordial. La présence de composés microbiens pro-inflammatoires peut aussi faire pencher la balance. Un modèle propose également qu'un antigène présent en petites quantités et interagissant faiblement avec le TCR induira une différenciation des cellules T naïves en Th2, alors qu'à l'opposé un antigène abondant et ayant une haute affinité pour le TCR guidera vers une réponse Th1 (Chaturvedi *et al.*, 1996). Cette théorie expliquerait pourquoi de petites quantités d'antigène n'activent aucun mécanisme pro-inflammatoire et provoquent plutôt des allergies de type I (IL-4 et IgE dépendants), alors que de fortes doses peuvent avoir un effet anti-allergique.

Il est à noter que même si les profils Th1 et Th2 sont mutuellement exclusifs, ils ne représentent que les extrêmes d'un spectre de différenciation continu. On peut détecter des cellules Th1 produisant un peu d'IL-4 et des Th2 sécrétant un peu d'IFN- $\gamma$ . De nos jours, on parle davantage de réactions "orientées Th1" ou "orientées Th2", avec le Th0 en guise de point d'équilibre et de point de départ.

### **3.5 L'interféron gamma (IFN- $\gamma$ )**

#### **3.5.1 Structure**

Le gène codant pour l'IFN- $\gamma$  est situé sur le chromosome 10 humain et 12 murin. Il contient 3 introns donnant naissance à un ARNm de 1,2 kb et à un polypeptide de 166 acides aminés. Après maturation, la protéine humaine est formée de 143 acides aminés d'une masse totale de 17 kDa (Thèze, 1999). Elle est N-glycosylée à deux endroits. On retrouve l'IFN- $\gamma$  biologiquement actif sous forme d'homodimère relié dans une configuration antiparallèle par des liens non-covalents. L'IFN- $\gamma$  est très spécifique à l'espèce; les formes humaines et murines n'ont que 60% d'homologie au niveau génique et 40% d'homologie au niveau protéique (Thèze, 1999).

#### **3.5.2 Récepteur de l'IFN- $\gamma$**

Le récepteur cellulaire d'IFN- $\gamma$  est le récepteur de cytokines le mieux défini jusqu'à présent. Une grande quantité de données a été récoltée sur la transduction du signal de l'IFN- $\gamma$  de la membrane vers le noyau, nous permettant d'élucider les origines des effets biologiques de cette cytokine. Le récepteur de l'IFN- $\gamma$  (interféron de type II) a des homologies structurelles et fonctionnelles avec le récepteur d'interférons de type I (IFN- $\alpha$  et  $\beta$ ).

Le récepteur est composé de deux chaînes, alpha et bêta, codées sur des gènes différents. La première, aussi nommé IFN $\gamma$ R1, a une masse de 90 kDa et participe à la liaison au ligand. La seconde, connue sous le nom de IFN $\gamma$ R2, est responsable de la transduction du signal. Le gène de cette dernière peut être régulé à la baisse dans certaines cellules différenciées pour les rendre insensibles à l'IFN- $\gamma$ . Les deux chaînes ne sont pas reliées et ne forment un complexe qu'en présence du ligand (Thèze, 1999).

L'IFN- $\gamma$  est un dimère qui peut se lier à deux chaînes alpha et les faire interagir. Jak1 et Jak2, des tyrosine kinases de la famille des tyrosine kinases Janus, sont liées en permanence aux chaînes alpha et bêta, respectivement. Lors de la dimérisation de la chaîne alpha, des sites de liaison aux chaînes bêta apparaissent, recrutant ces dernières et mettant les kinases à proximité. Celles-ci se transactivent par phosphorylation et ensuite phosphorylent les tyrosines Tyr440 sur les chaînes alpha. Ces deux sites phosphorylés permettent à des molécules Stat1, des facteurs de transcription de la famille des STATs, de venir s'y arrimer et d'être à leur tour phosphorylés par les Jak1 et Jak2. Les Stat1 phosphorylés se détachent et forment des homodimères et se relocalisent au noyau, où ils se lient à des éléments de réponse sur l'ADN connues sous le nom de GAS pour *gamma activated sites*. Ces éléments sont situés sur les promoteurs de gènes induits par l'IFN- $\gamma$ ; la transcription de ces gènes sera induite à la suite de l'arrivée de complexes Stat1/Stat1 actifs (Darnell *et al.*, 1994).

### 3.5.3 Induction et production

Les événements menant à la production d'IFN- $\gamma$  ont été en partie décrits lors des discussions sur l'IL-12 et les réponses Th1 et Th2. Contrairement aux autres espèces d'interférons, l'IFN- $\gamma$  est produit par un nombre restreint de types cellulaires. Les cellules T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> Th1 ou Th0, ainsi que les cellules NK et NK-T, produiront de l'IFN- $\gamma$  après activation. La figure 5 montre les différentes interactions menant à la production d'IFN- $\gamma$  dans des conditions physiologiques. Des activateurs polyclonaux de cellules T comme des anti-CD3, la ConA, la PHA, etc., peuvent stimuler sa production *in vitro*. Un anticorps dirigé contre CD3 active directement le complexe du TCR sans passer par la reconnaissance d'un antigène dans le contexte d'une molécule du CMH. La ConA (concanavaline A) et la PHA (phytohématagglutinine) sont des lectines se liant à des sucres présents sur des glycoprotéines membranaires et induisant leur aggrégation, ce qui entraîne une signalisation généralisée et une activation de la cellule..

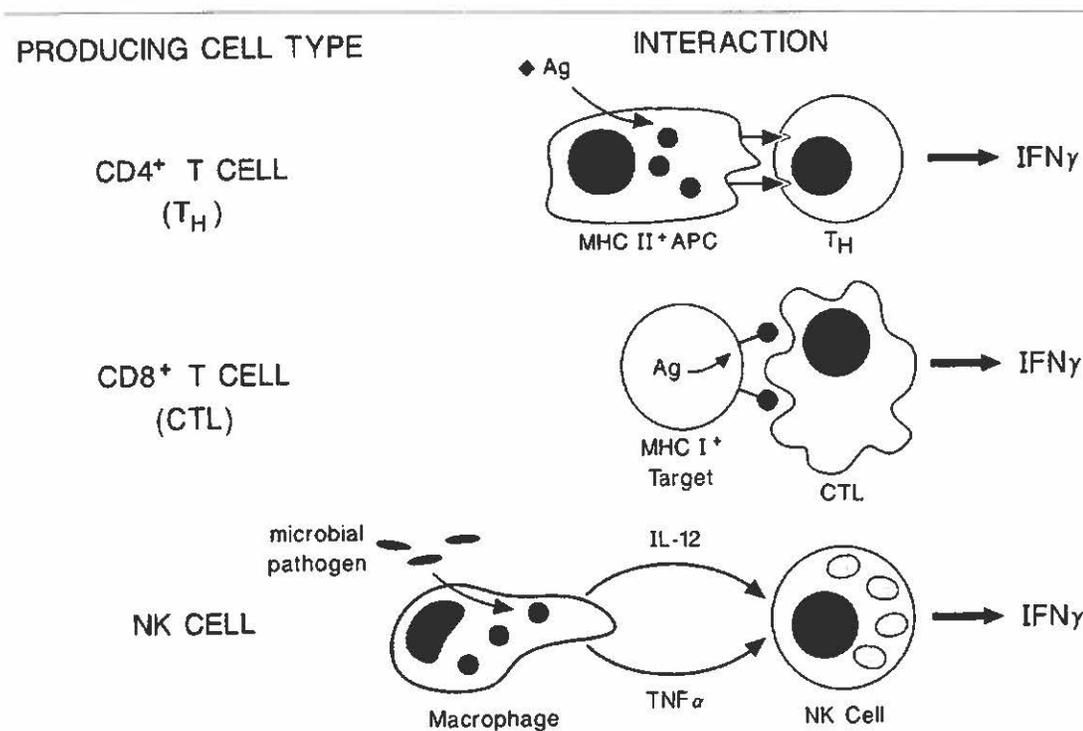
La stimulation du gène de l'IFN- $\gamma$  commence entre 6 et 8 heures après stimulation et les taux d'ARNm cytosolique ainsi que de protéines extracellulaires atteignent leur maximum après 24h. L'activation des cellules T *in vivo* est dépendante de l'interaction du

TCR (sur la cellule T) avec une molécule du CMH (sur la cellule cible), accompagnée des molécules accessoires CD4 ou CD8. Chez les NK, la production d'IFN- $\gamma$  peut être induite simplement par la présence d'IL-12, d'IL-1 $\beta$  et de TNF produits par les macrophages en réponse à un stimuli microbien (Gately *et al.*, 1992). L'IL-18 amplifie fortement cette stimulation chez les NK (Zhang *et al.*, 1997). L'IL-2, produite par les cellules T, est un activateur majeur bien connu des cellules NK. Cette cytokine peut induire à elle-seule la différenciation de cellules NK au repos en cellules LAK ("lymphokine-activated killer") qui démontrent des activités cytotoxiques et une sécrétion d'IFN- $\gamma$  accrues (Blanchard *et al.*, 1983). La cellule NK représente donc une source rapide d'IFN- $\gamma$  qui pourra activer les macrophages, stimulant davantage la production d'IL-12 et établissant une boucle rétro-positive antimicrobienne. Avec l'IL-2, la boucle se maintient dans une réponse immunitaire avancée en activant également les cellules T du type Th1, qui sécréteront davantage d'IFN- $\gamma$  (Kasahara *et al.*, 1983). Voir la figure 5 pour une illustration des différentes interactions menant à une production d'IFN- $\gamma$ .

#### 3.5.4 Effets biologiques

Les interférons furent connus en premier pour leur capacité d'interférer avec la réplication virale, d'où leur nom. Les interférons ont une activité antivirale et antiproliférative intrinsèque, c'est à dire qu'ils ne nécessitent pas la participation d'autres cellules ou d'autres facteurs exogènes. Dans le cas de l'IFN- $\gamma$ , cette activité est bonifiée d'un pouvoir immunomodulateur de premier plan dont la conséquence est l'activation de l'immunité cellulaire, au pouvoir antimicrobien et antitumoral bien connu. Cette cytokine est pléiotropique, elle peut agir sur un grand nombre de cellules et provoquer des réactions diverses.

L'interféron bloque la réplication virale en induisant trois protéines qui bloquent certaines étapes de la réplication virale. La première est la 2'-5' oligoadénylate synthétase qui polymérise l'ATP en chaînes 2'-5'. Ce produit active la RNase L, une enzyme qui détruit tout ARN cellulaire et viral. La seconde est PKR, une protéine kinase qui phosphoryle un facteur d'initiation à la traduction, eIF2 et le rend inactif. Ces deux enzymes sont dépendantes de la présence d'ARN double-brin pour leur activation et



**Figure 5:** Production d'IFN- $\gamma$  en réponse à des interactions intercellulaires ou paracrines (cytokines). (Tiré de Thèze, 1999; p. 191)

exercent leur action antivirale en bloquant la synthèse protéique. La troisième, induite seulement par les interférons de type I, est la protéine Mx, qui inhibe la réplication des orthomyxovirus (Thèze, 1999).

Comme il fut mentionné précédemment, l'IFN- $\gamma$  est le principal activateur des macrophages. Il active à la fois les fonctions microbicides du phagocyte et ses fonctions de traitement et de présentation d'antigène. Le signal qu'envoie l'IFN- $\gamma$  aux macrophages, en conjonction avec celui envoyé par le TNF, l'IL-1 ou le LPS, provoque la fusion de lysosomes avec des vésicules endosomales dans lesquelles on peut retrouver des bactéries ou parasites vivants. Le signal active également l'enzyme iNOS (NO synthase inducible) qui produit de l'oxyde nitrique (NO) et la NADPH oxydase qui génère des anions superoxydes (Cassatella, 1990; Xie *et al.*, 1993). Ces deux substances sont hautement toxiques pour les micro-organismes environnants ainsi que pour des cellules cancéreuses.

L'IFN- $\gamma$  a la capacité unique de réguler à la hausse l'expression des molécules du CMH de classe II. Les CPA (macrophages, cellules dendritiques) mais aussi les cellules épithéliales et endothéliales, répondent de la sorte en présence d'IFN- $\gamma$  (Sztejn *et al.*, 1984; Nakamura *et al.*, 1984; Ohmann *et al.*, 1988). L'ensemble de ces actions a pour conséquence un fonctionnement plus efficace de la surveillance immunitaire par les cellules T CD4<sup>+</sup>. Les différentes familles d'interférons agissent aussi sur les cellules somatiques non immunitaires pour augmenter l'expression des molécules de CMH I et de la  $\beta$ 2-microglobuline. Dans la même veine, l'interféron augmente l'expression de molécules impliquées dans le traitement et la présentation des antigènes cytoplasmiques, entre autre TAP1 et 2, LMP2 et 7 (Gaczynska *et al.*, 1993), PA28 (Groettrup *et al.*, 1996). Ces molécules facilitent la génération de peptides antigéniques pouvant être reconnues par les CTL CD8<sup>+</sup> (Gaczynska *et al.*, 1993).

L'IFN- $\gamma$  joue un rôle dans la régulation des réponses Th1/Th2 à plusieurs niveaux. Premièrement, il supprime la production d'IL-4 chez les cellules Th2 (Szabo *et al.*, 1995). Il exerce aussi une action antiproliférative sur ces dernières. Les cellules Th1 sont dépourvues du récepteur IFN $\gamma$ R2, ce qui les protège des effets anti-Th2. Ensuite, il maintient l'expression de l'IL-12R $\beta$ 2 chez les cellules T naïves, les gardant sensibles à l'IL-12 (Szabo *et al.*, 1997).

Finalement, l'IFN- $\gamma$  agit sur le fonctionnement des cellules B. Chez la Souris, il provoque chez la commutation de classe de IgM à IgG2a et IgG3 et bloque la commutation vers IgG1 et IgE induite par l'IL-4 (Bossie et Vitetta, 1991; Xu et Rothman, 1994). L'isotype IgG2a fixe le complément et, avec IgG3, contribue à la cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante (ADCC) en se liant au récepteur Fc $\gamma$ R1 sur les macrophages ou au CD16 sur les NK (Akiyama *et al.*, 1984). L'inhibition de la conversion vers IgE est responsable de l'effet anti-allergique de l'IFN- $\gamma$  *in vivo*. La commutation vers IgG2a et IgG3 assiste l'immunité cellulaire en facilitant la phagocytose de particules et en permettant la destruction par ADCC de cellules infectées ou tumorales affichant des antigènes étrangers à leur surface.

## 3.6 L'interleukine-4

### 3.6.1 Structure

L'IL-4 humaine est une protéine glycosylée de 15-19 kDa composée de 153 acides aminés dont 24 pour le peptide de signal. L'IL-4 murine est formé de 140 acides aminés dont 20 pour le peptide de signal. Les cytokines humaines et murines présentent 50% d'homologie au niveau de la protéine, mais n'ont pas d'activité trans-espèce (Chomarat et Banchereau, 1997). L'IL-4 a une structure tridimensionnelle semblable à celle d'autres cytokines comme l'IL-13, l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-9.

### 3.6.2 Récepteur de l'IL-4

Le récepteur de l'IL-4 fait partie de la grande famille des récepteurs hématopoïétiques de type 1, comprenant entre autres l'IL-2R $\beta/\gamma$ , l'IL-9R, les récepteurs de l'érythropoïétine et de l'hormone de croissance. Plusieurs des récepteurs de cette famille partagent des sous-unités et peuvent prendre plusieurs formes liant les cytokines avec des affinités variables. L'IL-4 partage des unités avec les récepteurs de l'IL-2 et de l'IL-13. La partie IL-4R $\alpha$  participe toujours au complexe et est nécessaire à la transduction du signal via sa portion cytoplasmique. Cependant, elle n'a qu'une faible affinité pour l'IL-4 en solo. L'IL-4R $\alpha$  peut se complexer avec l'IL-2R $\gamma$  pour former un récepteur à haute affinité. De plus, il peut s'associer avec l'IL-13R $\alpha$  et constituer le récepteur IL-4R/IL-13R conjoint qui lie à la fois l'IL-4 et l'IL-13 à haute affinité. L'IL-4R $\alpha$  a une masse de 140 kDa; il comprend une partie extracellulaire de 207 a.a. (208 chez la Souris), une portion transmembranaire de 24 a.a. et une longue queue cytoplasmique de 569 a.a. (Souris : 553). Le signal envoyé par l'IL-4R semble emprunter la voie Jak/STAT et utilise Jak-3 et STAT-6. L'IL-4R est exprimé principalement chez la plupart des cellules hématopoïétiques, de même que par les kératinocytes et les fibroblastes (Chomarat et Banchereau, 1997).

### 3.6.3 Induction et production

L'IL-4 est produit par des lymphocytes Th0 et Th2 lorsque activés par un antigène spécifique à leur TCR. Des signaux mitogéniques comme la ConA, l'anti-CD3 et la PMA (phorbol myristate acétate) / ionomycine<sup>1</sup> peuvent également induire son expression

(Carding *et al.* 1989). L'IL-4 n'est pas produit par des cellules T naïves. Par conséquent, d'autres sources d'IL-4 doivent exister pour expliquer l'apparition d'une réponse Th2 face à un nouvel antigène. Les mastocytes et les basophiles produisent de grandes quantités d'IL-4 lorsqu'elles sont activées par la liaison IgE-antigène via leur récepteur FcεRI (Romagnani *et al.*, 1991); ceci permettrait une réponse Th2 rapide et précoce. Une autre source d'IL-4 proviendrait de cellules T "NK" (NK1.1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, TCR αβ). Ces cellules ont un TCR restreint à des antigènes présentés dans le contexte de la molécule du CMH 1b non-classique CD1, elles ne dépendent donc pas de la présence de CMH II comme les Th2 (Yoshimoto et Paul, 1994). Cependant, des souris CD1<sup>-/-</sup> peuvent tout de même monter une réponse Th2, ce qui ne permet pas de croire que ces cellules constituent la source primaire d'IL-4 (Chen *et al.*, 1997). Un sous-ensemble de cellules T TCR γδ restreint à CD1 et sécrétant de l'IL-4 pourrait aussi représenter le premier pas vers une réponse Th2 (Ferrick *et al.*, 1995). Il est à noter que des souris IL-4<sup>-/-</sup> ont une capacité réduite mais non nulle de réponse Th2 (Von der Weid *et al.*, 1994), ce qui suggère que l'IL-4 serait utile pour l'amplification de la réponse Th2 mais non-essentielle pour son initiation.

### 3.6.4 Effets biologiques

Comme il fut discuté précédemment, l'IL-4 a un effet sur les lymphocytes T en promouvant la réponse Th2 et en réprimant la réponse Th1. L'IL-4 a aussi un effet autocrine sur les cellules Th2 en stimulant leur croissance ainsi que leurs activités sécrétrices et auxiliaires.

L'activité anti-Th1 de l'IL-4 est partiellement responsable des propriétés anti-inflammatoires de cette cytokine. L'IL-4 inhibe également la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-8, IL-1β), et prévient la phagocytose et la flambée oxydative chez les monocytes/macrophages (Becker et Daniel, 1990; Standiford *et al.*, 1990; Swisher *et al.*, 1990). Toutefois, ses effets sont ambivalents et dépendent de la présence d'autres facteurs (Phillips *et al.*, 1990). L'IL-4 supprime la génération de cellules LAK

---

1. La PMA est une molécule hydrophobe capable de court-circuiter la signalisation intracellulaire et d'activer certains isoformes de protéines kinases C (PKC). L'ionomycine est un ionophore qui provoque la libération des stocks de calcium intracellulaire.

(*lymphokine activated killer*) dépendante de l'IL-2 à partir de cellules NK (Swisher *et al.*, 1990).

L'IL-4 est un facteur de différenciation et de croissance des cellules B. Elle fait partie, avec l'interaction CD40L/CD40 et TCR/CMH, du signal envoyé par la cellule T auxiliaire pour activer la cellule B et la transformer en cellule productrice d'anticorps (Parker, 1993). À cet instant, l'IL-4 est produite localement, dans l'espace compris entre la cellule Th2 et la cellule B. Ce signal induit la prolifération de la cellule B et la commutation de classe vers les isotypes IgG1 (IgG4 chez l'Humain) et IgE (Bergstedt-Lindqvist *et al.*, 1988; Lundgren *et al.*, 1989). Les IgG1 ne fixent pas le complément et exercent donc une action exclusivement neutralisante qui ne provoque pas de réaction inflammatoire. Les IgE se fixent aux récepteurs de haute affinité IgεR sur les mastocytes et participent aux réactions allergiques et anti-parasitaires.

## **4 Effets des bactéries lactiques sur l'immunité**

Une quantité impressionnante de données à été accumulée au cours des deux dernières décennies sur l'effet modulateur qu'auraient les bactéries lactiques sur le système immunitaire. De nombreuses équipes se sont penchées sur les actions observées *in vitro*, *in vivo* chez des animaux ou chez l'homme, ou dans le cadre d'essais cliniques avec un échantillonnage de la population. Plusieurs années se sont écoulées depuis le début des expériences. Les résultats des premières années documentant des effets sur la santé furent enrichis par des données plus récentes décrivant les mécanismes en jeu. Cependant, un modèle compréhensif retraçant toutes les étapes et interactions dans ce phénomène manque encore.

### **4.1 Études *in vitro***

Le tableau II énumère une sélection de travaux qui ont utilisé des modèles expérimentaux *in vitro* pour étudier l'effet immunomodulateur des bactéries lactiques. Les expériences *in vitro* utilisent des cultures de cellules animales immunocompétentes qui sont mises en contact avec des bactéries ou leurs produits. Ces cellules peuvent provenir de lignées cellulaires établies, ou avoir été prélevées sur des animaux ou chez l'homme.

Modèle	Produits testés	Résultats	Référence
Macrophages péritonéaux murins	<i>L. acidophilus</i> (4 souches)	↑ IFN- $\alpha\beta$	Kitazawa <i>et al.</i> , 1992
Macrophages murins J774	Extraits de <i>L. acidophilus</i> et <i>B. longum</i>	↑ phagocytose de particules inertes ou de <i>S. thyphimurium</i> viable .	Hatcher et Lambrecht, 1993
PBMC humains	<i>B. longum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>B. animalis</i> , <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. rhamnosus</i> E509, <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>E. coli</i> (contrôle). Viables ou fixées.	↑ TNF, ↑ IL-6. Différences significatives entre les bactéries. Bactéries viables meilleures.	Miettinen <i>et al.</i> , 1996
PBMC humains.	<i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> . Irradiés ou vivants	↑ TNF, ↑ IL-1 $\beta$ , ↑ IFN- $\gamma$	Solis-Pereyra <i>et al.</i> , 1997
Macrophages murins RAW 264.7 et cellules Th EL4.IL-2 murines.	<i>L. bulgaricus</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>S. thermophilus</i> (4 souches commerciales)	↑ IL-6, ↑ TNF chez les M $\phi$ . ↑ IL-2 et IL-5 chez les cellules T activées avec PMA <i>S. thermophilus</i> plus stimulant	Marin <i>et al.</i> , 1998
Cellules de ganglions et de rate de Souris. Macrophages péritonéaux.	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i>	↑ prolifération de cellules spléniques et de ganglion; ↑ production d'anticorps, ↑ NO, IL-6, TNF par les M $\phi$ .	Lee, 1998
Splénocytes de Souris sensibilisées à l'ovalbumine	<i>L. casei</i>	↑ IL-12, ↑ IFN- $\gamma$ , ↓ IL-4, ↓ IL-5 Suppression d'IgE total et spécifique à l'ovalbumine. Induction de développement Th1.	Shida <i>et al.</i> , 1998
PBMC humains	<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. rhamnosus</i> E509, <i>L. bulgaricus</i> , <i>S. pyogenes</i> (contrôle)	↑ TNF, ↑ IL-6, ↑ IL-10, ↑ IFN- $\gamma$ , ↑ IL-12, ↑ IL-18 Toutes les bactéries positives, <i>S. pyogenes</i> plus fort.	Miettinen <i>et al.</i> , 1998
Splénocytes murins	<i>L. casei</i> Shirota (thermo-inactivé)	↑ IFN- $\gamma$ (avec ConA), ↑ IL-12	Kato <i>et al.</i> , 1999
PBMC humains	<i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. paracasei</i> . <i>E. coli</i> (contrôle). Deux souches chaque. Inactivés aux UV.	Lactobacilles : ↑ IL-12. [ <i>L. paracasei</i> : très élevé]. Bas niveau d'IL-10. <i>E. coli</i> : ↑ IL-10. Bas niveau d'IL-12.	Hessle <i>et al.</i> , 1999

**Tableau II:** Exemples d'expériences *in vitro* étudiant l'impact des bactéries lactiques sur des cellules immunocompétentes en culture.

Elles peuvent être mixtes et représenter un mélange de plusieurs types cellulaires, ou être fractionnées en sous-groupes relativement purs.

De nombreuses expériences ont démontré l'induction de cytokines par différentes bactéries lactiques chez les monocytes du sang périphérique humain (PBMC) : le TNF (Solis-Peyrera *et al.*, 1997; Miettinen *et al.*, 1996; Puddu *et al.*, 1997), l'IL-1 $\beta$  (Solis-Peyrera *et al.*, 1997), l'IL-6 (Miettinen *et al.*, 1996; Puddu *et al.*, 1997), l'IFN- $\gamma$  (Solis-Peyrera *et al.*, 1997; Puddu *et al.*, 1997), l'IL-12 (Puddu *et al.*, 1997; Hessle *et al.*, 1999) et l'IL-18 (Puddu *et al.*, 1997). Des différences significatives furent observées entre les bactéries du point de vue de leur pouvoir immunostimulateur (Miettinen *et al.*, 1996; Hessle *et al.*, 1999). En général, les bactéries viables ou irradiées sont plus efficaces que les bactéries tuées chimiquement ou par la chaleur (Miettinen *et al.*, 1996; Solis-Peyrera *et al.*, 1997). Les traitements thermiques ou chimiques ont en effet tendance à dénaturer les composantes membranaires responsables de l'activation de l'immunité innée.

Des modèles murins *in vitro* ont également été exploités. Ils offrent l'avantage d'être plus fiables, les souris utilisées étant génétiquement homogènes et élevées dans des conditions contrôlées. Ils permettent également d'étudier les réactions de cellules immunitaires plus variées provenant de la rate ou des ganglions lymphatiques. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF, IL-12) suite à la stimulation par des bactéries lactiques a été notée chez les macrophages de Souris (Marin *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 1999; Lee, 1998; Shida *et al.*, 1998). Ces bactéries stimulent aussi la production d'IFN- $\gamma$  chez les splénocytes activés, de façon IL-12 dépendante. La neutralisation de l'IL-12 par un anticorps abolit l'effet pro-interféron des bactéries étudiées (Kato *et al.*, 1999; Shida *et al.*, 1998).

D'autres effets sur les cellules de Souris ont été répertoriés. Des extraits bactériens augmentent la phagocytose de particules inertes ou bactériennes chez les macrophages (Hatcher et Lambrecht, 1993) et leur production de nitrite (Lee, 1998). Des bifidobactéries induisent la prolifération de cellules spléniques ou de ganglions et augmente leur production d'anticorps. Chez des splénocytes provenant de souris sensibilisées à l'ovalbumine (OVA), les bactéries lactiques suppriment la production d'IgE total et OVA-

spécifique ainsi que la production des cytokines Th2 IL-4 et IL-5, orientant le développement de cellules T vers le profil Th1 (Shida *et al.*, 1998).

## 4.2 Études *in vivo*

Le tableau III récapitule certaines études faites sur des animaux ou sur l'Humain chez qui des bactéries lactiques ont été administrées. Plusieurs paramètres immunologiques ont été mesurés pour évaluer la réaction de l'organisme aux produits reçus:

- Prolifération de cellules (T, B, spléniques, etc.) suite à une stimulation *ex-vivo*.
- Macrophages: Indice de phagocytose (*ex-vivo*), activité enzymatique (iNOs,  $\beta$ -glucuronidase).
- Activité cytotoxique NK et CTL.
- Sécrétion d'immunoglobulines (IgA, IgG, IgE, IgM) totales.
- Expression de l'ARNm de cytokines.
- Sécrétion de cytokines. Après stimulation *ex-vivo* ou tissulaire, mucoale (plaques de Peyer), systémique (sérum, rate ganglions).
- Nombre de cellules sécrétrices (cytokines et anticorps).
- Sous-populations de lymphocytes dans les tissus (CD4, CD8, etc).
- Coupes histologiques.
- Résistance à des pathogènes et production d'anticorps spécifiques.

Une masse considérable de travaux ont été effectués sur les effets *in vivo* des bactéries lactiques, dans des contextes de santé ou de maladies. Les études portant sur la modulation de la réponse immunitaire remportent la palme en ce qui a trait à la diversité des paramètres mesurés et des résultats obtenus.

Les modèles utilisant des animaux en santé se sont surtout concentrés sur la modulation des capacités immunitaires basales ou induites par un mitogène ou un antigène. Plusieurs équipes ont souligné une augmentation de la capacité phagocytaire des macrophages ou du système réticulo-endothélial chez des souris ou des humains auxquels des bactéries lactiques avaient été administrées (Kato *et al.*, 1983; Perdigon *et al.*, 1986 et 1988; Popova *et al.*, 1993; Paubert-Braquet, 1995, Morata de Amrosini *et al.*, 1998; Gill *et al.*, 2000). Les cellules NK, qui constituent une autre branche de l'immunité innée, furent

Modèle	Produits administrés	Route	Résultats	Référence
Souris	<i>L. casei</i>	Intrapéritonéale (i.p.)	↑ macrophages péritonéaux, ↑ phagocytose <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	Kato <i>et al.</i> , 1983
Souris	<i>L. casei</i>	i.p. Intravéneuse (i.v.)	↑ activité NK des splénocytes	Kato <i>et al.</i> , 1984
Souris	<i>L. casei</i> <i>L. bulgaricus</i>	i.p. orale	↑ phagocytose <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> ↑ activité enzymatique des MΦ	Perdigon <i>et al.</i> , 1986
Souris	<i>L. acidophilus</i> <i>L. bulgaricus</i>	i.p. orale	↑ phagocytose <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> ↑ activité enzymatique des MΦ ↑ cellules sécrétrices d'anticorps	Perdigon <i>et al.</i> , 1987
Souris (suisses)	<i>L. casei</i> et <i>L. acidophilus</i> dans lait fermenté	Orale	↑ phagocytose <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> ↑ activité enzymatique des MΦ ↑ cellules sécrétrices d'anticorps	Perdigon <i>et al.</i> , 1988
Souris	<i>L. casei</i> fractionné	i.p.	↑ résistance à MCMV, ↑ activité NK (souris malades ou saines) [cellules entières > glycoprotéine membranaire > paroi cellulaire >> cytoplasme] Pas d'effet sur l'IFN sérique.	Ohashi <i>et al.</i> , 1989
Souris	<i>L. casei</i> et <i>L. acidophilus</i> dans lait fermenté	Orale	Protection contre la colonisation splénique et hépatique par <i>S. typhimurium</i> . ↑ anticorps contre <i>Salmonella</i> . ↑ taux de survie.	Perdigon <i>et al.</i> , 1990
Souris	<i>L. bulgaricus</i>	Orale	↑ IL-1 par MΦ péritonéaux, ↑ phagocytose. ↓ mortalité après infection avec <i>Klebsiella pneumoniae</i> et <i>Listeria monocytogenes</i>	Popova, 1993
Souris pré-immunisées avec une tumeur	<i>L. casei</i> Shirota (LcS) viable	Orale	Suppression de la tumeur secondaire. Restauration de la réponse proliférative et sécrétoire (IL-1, IL-2) des splénocytes.	Kato <i>et al.</i> , 1994
Souris immunisées contre l'influenza	<i>Bifidobacterium breve</i>	Orale	↓ morbidité et mortalité par le virus de l'influenza. ↑ IgG anti-influenza par les cellules des plaques de Peyer et dans le sérum.	Yasui <i>et al.</i> , 1994, 1999
Souris	<i>L. casei</i> Yogourt	Orale	↑ phagocytose <i>in vivo</i> ↑ activité enzymatique des MΦ ↑ IgA sérique	Paubert-Braquet <i>et al.</i> , 1995
Souris <i>bg/bg-nu/nu</i> ou <i>bg/bg-nu/+</i> colonisés avec <i>C. albicans</i>	<i>L. casei</i> GG, <i>L. acidophilus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>B. animalis</i>	Oral	Protection partielle contre la candidiase systémique léthale. <i>B. animalis</i> : ↑ anticorps, ↑ inflammation.	Wagner <i>et al.</i> , 1997

**Tableau III:** Exemples d'expérience *in vivo* sur des modèles animaux chez lesquels des bactéries lactiques ont été administrées (page 1 de 2).

Modèle	Produits administrés	Route	Résultats	Référence
Souris	<i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> . Parois cellulaires et muréine séparées.	Orale	<i>L. casei</i> : ↑ phagocytose, nul IgA <i>L. acidophilus</i> : ↑ IgA, nul phagocytose.	Morata de Ambrosini <i>et al.</i> , 1998
Souris nourries à la caséine	<i>L. plantarum</i>	i.p.	↓ IgE anti-caséine sérique. ↑ IL-12 sérique et des MΦ péritonéaux. ↓ IL-4 par les splénocytes+ConA.	Murosaki <i>et al.</i> , 1998
Souris BALB/c	<i>L. casei</i> Shirota (LcS)	Orale	↑ IFN-γ par splénocytes activés à la ConA. Pas d'effet sur l'IL-4 ni IL-5	Kato <i>et al.</i> , 1999
Souris axéniques	<i>L. plantarum</i> + <i>E. coli</i>	Orale	↑ IgA contre <i>E. coli</i> . ↑ cellules IL-2Rα. ↓ prolifération de splénocytes.	Herias <i>et al.</i> , 1999
Souris	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>S. thermophilus</i>	Orale	Pas d'effet sur les niveaux basaux d'Ig ou d'ARNm de cytokines (IL-6, TNF, IFN-γ) dans la rate et les PP.	Tejada-Simon, 1999
Souris	Yogourt avec ou sans <i>Bifidobacterium</i> sp. <i>L. acidophilus</i>	Orale	Pas d'effet sur l'ARNm basal de cytokines (TNF, IFN-γ, IL-6 et IL-4) dans la rate et les PP.	Ha <i>et al.</i> , 1999
Souris IL-10 déficientes	<i>L. reuteri</i> Lactobacilles endogènes	Rectal Thérapie orale au lactulose	↓ translocation de bactéries, ↓ inflammation/colite.	Madsen <i>et al.</i> , 1999
Souris	<i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. rhamnosus</i>	Orale	<i>L. acidophilus</i> : ↑ prolifération spontanées de splénocytes. Autres : ↓ prolifération par ConA et LPS à des concentrations supra-optimales.	Kirjavainen <i>et al.</i> , 1999
Souris	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>B. lactis</i>	Orale	↑ phagocytose des PBMC et des macrophages péritonéaux. ↑ prolif. et ↑ IFN-γ des splénocytes en réponse à des mitogènes. ↑ anticorps contre antigènes systémiques et oraux.	Gill <i>et al.</i> , 2000
Souris	<i>L. casei</i> Shirota Levure <i>L. fermentum</i> <i>S. thermophilus</i>	Orale, intrapleurale	LcS : ↑ activité NK des splénocytes, inhibition de tumeurs, production d'IL-12 <i>in vitro</i> , ↓ IgE anti-OVA après immunisation, ↑ cytokines Th1 en réponse à OVA. <i>S. thermophilus</i> : ↑ lymphoprolifération des splénocytes à OVA. <i>S. thermophilus</i> , levure et <i>L. fermentum</i> : ↓ prolif. si administré avec OVA (tolérance).	Matsuzaki et Chin, 2000

**Tableau III:** Exemples d'expérience *in vivo* sur des modèles animaux chez lesquels des bactéries lactiques ont été administrées (page 2 de 2).

également stimulées (Kato *et al.*, 1984; Matsuzaki et Chin, 2000), ce qui sembla conférer une résistance à des infections virales (Ohashi *et al.*, 1989). En général, aucun changement dans la taille ou la composition de populations de cellules immunitaires (ex.: CD4/CD8) ne fut observée. La lymphoprolifération basale de splénocytes provenant de souris gavées avec *L. acidophilus* est potentialisée. À l'opposé, elle est réduite chez des splénocytes activés avec des doses supra-optimales de LPS et ConA lorsque les souris ont été gavées avec d'autres espèces de bactéries (Kirjavainen *et al.* 1999).

La sécrétion d'anticorps est également induite par les bactéries lactiques (Perdigon *et al.*, 1987-1988; Paubert-Braquet *et al.*, 1995; Gill *et al.*, 2000). Cependant, dans des modèles d'allergie expérimentale, les niveaux d'IgE, totaux et spécifiques, furent diminués par certains probiotiques (Murosaki *et al.*, 1998; Matsuzaki et Chin, 2000). Ceci pourrait avoir une implication sur le traitement et la prévention d'allergies, et pourrait être relié à la modulation des réponses Th1/Th2.

Les cytokines furent également mesurées après le traitement d'animaux avec des bactéries lactiques. Les niveaux basaux d'expression de cytokines *in situ* sont peu affectés par une consommation chronique de bactéries lactiques (Ohashi *et al.*, 1989; Ha et al., 1999; Tejada-Simon, 1999). Néanmoins, les cellules immunitaires (splénocytes, macrophages péritonéaux) acquièrent au contact de ces bactéries une plus grande capacité à répondre à des stimuli antigéniques ou mitogéniques, par la production de cytokines comme l'IL-1, l'IFN- $\gamma$  et l'IL-12 (Popova *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1994-1999; Matsuzaki et Chin, 2000; Gill *et al.*, 2000).

Afin de démontrer l'efficacité thérapeutique des bactéries lactiques, plusieurs équipes ont conçu des modèles dans lesquels des souris étaient confrontées à des maladies ou à d'autres désordres. On évaluait alors l'influence des bactéries sur leur aptitude à résister à ces conditions et à récupérer leurs capacités immunitaires. Des bactéries données oralement purent protéger les souris contre des infections létales de Salmonelles (Perdigon *et al.*, 1990), de *Klebsiella pneumoniae* et *Listeria monocytogenes* (Popova *et al.*, 1998), du virus de l'influenza (Yasui *et al.*, 1999), de *Candida albicans* (Wagner *et al.*, 1997), et

de MCMV (Ohashi *et al.*, 1989). Dans tous les cas, la stimulation de l'immunité, en particulier la production d'anticorps spécifiques, fut notée.

Des équipes Japonaises travaillant sur *Lactobacillus casei*, souche Shirota (LcS), démontrèrent également une suppression de tumeurs secondaires chez des souris nourries avec la bactérie (Kato *et al.*, 1994). L'injection de LcS dans des souris inhibe le développement de tumeurs primaires (Matsuzaki et Chin, 2000). Le TNF semble être responsable de cette activité puisque sa neutralisation abolit l'action de ce probiotique.

Dans un modèle de souris axéniques, *L. plantarum* empêche la translocation de *E. coli* de l'intestin aux organes internes, en plus d'induire une production d'anticorps anti-*E. coli* et de calmer l'inflammation due à celle-ci (Herias *et al.*, 1999). Des observations similaires furent observées chez des souris IL-10 déficientes souffrant de colite qui furent colonisées avec des lactobacilles (Madsen *et al.*, 1999).

Certaines équipes ont fractionné les cellules bactériennes afin d'identifier le ou les composants responsables de la stimulation. Dans tous les cas, les fractions contenant la paroi cellulaire ou ses composants furent les plus actives, mais jamais autant que les cellules entières (Ohashi *et al.*, 1989; Morata de Ambrosini, 1998). Un examen plus profond des dépendances moléculaires et structurelles de la modulation de l'immunité est une priorité.

### **4.3 Essais cliniques**

Le tableau IV énumère les quelques essais cliniques complétés jusqu'à maintenant, qui ont tenté de faire un lien entre une consommation de produits fermentés et une certaine modulation des fonctions immunitaires. Des essais cliniques portant sur d'autres propriétés des bactéries lactiques, notamment l'abaissement du cholestérol sanguin et la régularité de la flore intestinale, furent également exécutés mais se retrouvent hors du spectre de notre sujet et ne seront donc pas discutés.

Les essais cliniques ont principalement démontré l'efficacité des bactéries lactiques dans des conditions pathologiques. On a décrit des effets bénéfiques sur les

Sujets	Produit testé	Résultats	Référence
21-56 ans (17) Sains	<i>L. bulgaricus</i> et <i>S. thermophilus</i> lyophilisés + 200g de yogourt	↑ lymphocytes B, NK, IFN-γ sérique et IgG sérique	De Simone <i>et al.</i> , 1989
1) 20-40 ans (42) 1) 55-70 ans (56) Sains	Yogourt actif ou traité à la chaleur	↓ symptômes allergiques dans les 2 groupes mangeant du yogourt actif. ↓ IgE et du LDL chez personnes âgées. Pas de diff. dans les autres paramètres sérologiques ou hématologiques.	Trapp <i>et al.</i> , 1993
Adultes sains	<i>L. acidophilus</i> <i>B. bifidum</i>	PBMC: ↑ phagocytose de <i>E. coli in vitro</i> . Pas de modification de sous-populations lymphocytaires.	Schiffrin <i>et al.</i> , 1994
138 patients ayant eu une résection d'une tumeur du cancer superficiel de la vessie	<i>L. casei</i> Shirota (Biolactis)	↓ le taux de réapparition de la tumeur.	Aso <i>et al.</i> , 1995
46 enfants (6-35 mois) souffrant de gastro-entérite rotavirale	<i>Lactobacillus</i> GG, <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i>	↓ durée de la diarrhée ↑ de cellules productrices d'anticorps et d'IgA sérique contre rotavirus. <i>L. GG</i> plus efficace	Majamaa <i>et al.</i> , 1995
27 enfants souffrant d'eczéma atopique et d'allergie au lait de vache	<i>Lactobacillus</i> GG	Amélioration clinique de la dermatite ↓ TNF fécal	Majamaa <i>et Isolauro</i> , 1997
Adultes hypersensibles au lait (+ groupe contrôle)	Lait avec <i>Lactobacillus</i> GG	Prévient la ↑ de CR1, CR3, FcγRIII et FcαR des neutrophiles et MΦ sanguins chez les sujets allergiques. ↑ les récepteurs chez les sujets sains.	Pelto <i>et al.</i> , 1998
Adultes sains	<i>L. johnsonii</i> La1 <i>S. thermophilus</i> Doses variables, seuls ou en combinaison	Produit avec 10 <sup>7</sup> <i>L. johnsonii</i> / mL ↑ l'activité oxydative et phagocytaire des leucocytes sanguins périphériques.	Donnet-Hughes <i>et al.</i> , 1999

**Tableau IV:** Exemples d'essais cliniques.

Différents paramètres immunitaires furent mesurés chez des groupes de personnes ayant consommé certains produits contenant des bactéries lactiques. Chaque essai comprend un groupe témoin et un ou plusieurs groupes traités.

enfants souffrant de diarrhée virale (Majamaa *et al.*, 1995), sur les opérés du cancer superficiel de la vessie (Aso *et al.*, 1995), et sur les personnes souffrant d'allergies nasales, cutanées ou alimentaires (Trapp *et al.*, 1993; Majamaa et Isolauri, 1997; Pelto *et al.*, 1998).

La plupart des essais cliniques ayant pour sujets des personnes restant en santé pendant tout le protocole ont noté peu ou pas d'influence des bactéries lactiques sur les paramètres immunologiques (Trapp *et al.*, 1993; Spanhaak *et al.*, 1998). Certains ont tout de même observé une augmentation du potentiel de l'immunité naturelle par l'augmentation de récepteurs chez les phagocytes (Pelto *et al.*, 1998) et par l'augmentation de leur capacité oxydative et phagocytaire (Donnet-Hughes *et al.*, 1999).

Ces résultats nous révèlent une importante ligne directrice dans la relation hôte-bactérie: la bactérie contribuerait à l'équilibre du système immunitaire. C'est pourquoi ses effets se manifestent dans des conditions où on retrouve un certain désordre immunologique. Ainsi, chez des personnes allergiques au lait, la bactérie *Lactobacillus* GG prévient l'augmentation de récepteurs phagocytaires apparaissant lors de la consommation de lait. À l'inverse, *L. GG* augmente l'expression de ceux-ci chez les personnes non allergiques (Pelto *et al.*, 1998). Puisque la consommation prolongée de produits fermentés ne pose aucun danger pour la santé, il est logique de croire que tout effet immunomodulateur des bactéries lactiques est auto-limitant chez un individu sain.

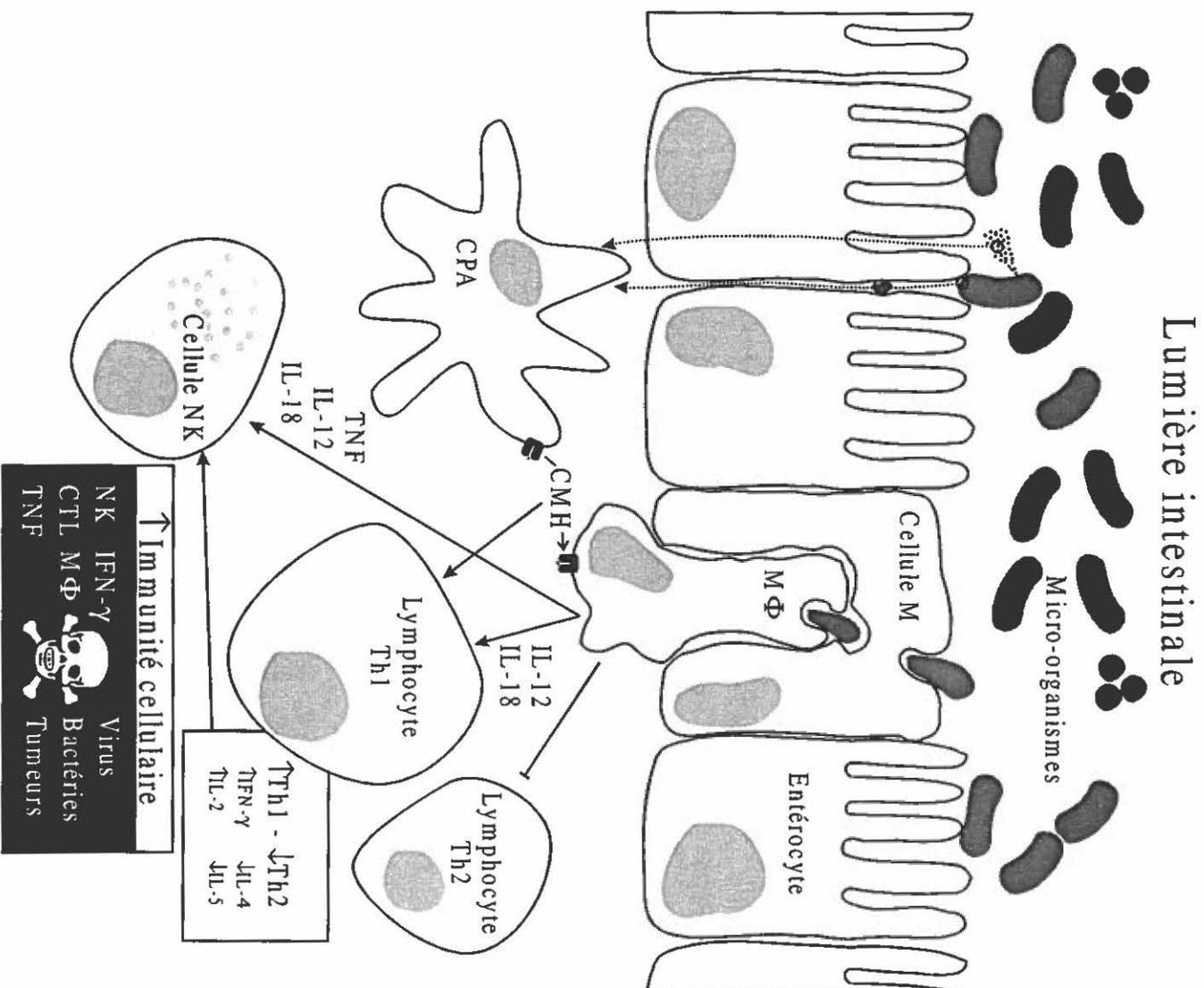
#### **4.4 Modèle d'action**

Même si la plupart des essais sur les animaux et sur l'Humain ont mesuré des paramètres immunologiques précis (ex: production d'anticorps ou de cytokines, expression de récepteurs, immunité cellulaire), aucun n'a pu expliquer avec exactitude les mécanismes qui entrent en jeu au niveau des cellules et des tissus. Cependant, la masse d'informations accumulée à propos des interactions hôte-bactérie dans le compartiment mucosal nous permet de concevoir un modèle expliquant l'action immunomodulatrice de certaines bactéries lactiques. La figure 6 illustre les différentes étapes, acteurs et relations proposés dans ce modèle.

La première étape est celle de l'adhésion de la bactérie à la muqueuse intestinale. Pour persister dans l'intestin et interagir avec les cellules lymphoïdes dans la muqueuse, une bactérie doit pouvoir adhérer fortement à l'épithélium (Ouwehand *et al.*, 1999). L'adhésion à la muqueuse serait aussi responsable de la compétition avec les pathogènes pour les sites d'attachement et inhiberait la translocation bactérienne (Ouwehand *et al.*, 1999). La morphologie de la paroi cellulaire semble jouer un rôle, mais le phénomène est encore mal compris et est difficile à reproduire en laboratoire.

Le micro-organisme, mort ou vivant, en suspension dans la lumière intestinale s'accroche à la surface de la muqueuse et peut être capturé par des cellules M spécialisées dans l'échantillonnage de particules intestinales. Situées à la surface de tissus lymphoïdes de l'intestin grêle, elles englobent des particules de la taille de bactéries et les transfèrent par transcytose à des macrophages dans la *lamina propria*. Le macrophage est activé par cette rencontre et produit des cytokines (IL-12, IL-18, TNF) en plus d'agir comme CPA et présenter à des cellules T CD4<sup>+</sup> des peptides antigéniques à sa surface à travers les molécules du CMH de classe II. Des composantes bactériennes peuvent également passer la muqueuse en traversant les entérocytes par pinocytose ou en passant à travers les jonctions intercellulaires (Madara, 1997). Ces macromolécules sont capturées par des cellules présentatrices d'antigènes et peuvent, comme les macrophages, activer les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

La présence d'IL-12 et d'IL-18 favorise le développement d'une réponse de type Th1 et la suppression de la réponse Th2. Ceci rendrait compte du renforcement de l'immunité cellulaire (cellules NK, CTL, et macrophages) chez l'hôte, ainsi que de l'action anti-allergique. Cependant, des cytokines suppressives comme le TGF- $\beta$  et l'IL-10 sont également produites lors d'une stimulation antigénique et empêchent que la réaction inflammatoire ne s'exacerbe. Le TGF- $\beta$  stimule également la production d'IgA sécrétoire par les plasmocytes de la lamina propria. La réponse IgA est essentielle pour instaurer et maintenir la tolérance de la flore commensale (Schroff *et al.*, 1995). Des bactéries probiotiques peuvent coloniser des souris axéniques et persister dans les tissus jusqu'à l'instauration d'une réponse IgA mucoale (Schroff *et al.*, 1995). Elles peuvent également se disséminer dans des souris immunodéficientes, mais sans causer de pathologie apparente (Wagner *et al.*, 1997).



**Figure 6:** Modèle d'action des bactéries lactiques sur le système immunitaire mucoosal et systémique, élaboré selon les connaissances actuelles.

# CHAPITRE 2 : MÉTHODOLOGIE

## 1 Préparation des bactéries

Toutes les bactéries furent obtenues sous forme lyophilisée soit du CRDA (St-Hyacinthe, Qc, Canada) ou de l'Institut Rosell-Lallemand (Montréal, Qc, Canada), et repiquées afin d'obtenir des stocks de bactéries vivantes. Les lactobacilles furent cultivées dans le milieu complexe sélectif MRS ("De Man-Rogosa-Sharpe"), *Streptococcus thermophilus* fut cultivé dans du milieu sélectif 17 (M17), et *Bifidobacterium longum* fut cultivé dans du RCM ("reinforced clostridial medium") tel que prescrit par les fournisseurs. Tous les produits de culture bactérienne furent obtenus de Difco (Difco Laboratories, Detroit, MI) et étaient de grade de laboratoire. Les milieux de culture furent stérilisés à l'autoclave avant usage.

Deux repiquages par bactérie dans leur milieu respectif furent effectués, espacés par des périodes d'incubation de 18h, afin de générer des stocks viables stables. L'incubation se faisait en aérobiose dans des jarres anaérobiques BBL™ GasPak™ (Becton Dickinson and Co, Sparks, MD) conservées dans un incubateur réglé à 37°C. Une dernière incubation de 6h pour les lactobacilles et *S. thermophilus* et de 18h pour *B. longum* permirent d'obtenir des bactéries dans la phase logarithmique. Un échantillon de chaque culture fut dilué en série et ensemencé sur gélose afin de connaître le nombre d'UFC par millilitre au moment de l'échantillonnage. La densité optique à 650 nm fut mesurée sur un autre échantillon de chaque culture. Ces données accumulées nous permirent de connaître le titre viable approximatif d'un échantillon pris durant la phase logarithmique en connaissant sa densité optique.

Des bactéries provenant de colonies isolées sur géloses furent emmagasinées dans un bouillon de BHI ("brain-heart infusion") + 15% vol./vol. de glycérol et congelées à -80°C dans des flacons stériles. Chaque espèce/souche fut repiquée de nouveau deux fois dans des tubes de culture puis incubée pendant 6h (18h pour *B. longum*) afin d'obtenir des stocks pour le protocole de stimulation. Les tubes furent irradiés au Centre d'Irradiation du Canada à des doses minimales pour obtenir une létalité de 100%, soit 5 kGy (500

kilorads) pour *S. thermophilus* et 3 kGy (300 kilorads) pour les autres souches bactériennes. La source était un irradiateur Gammacell-220 (MDS-Nordion, Kanata, ON, Canada) utilisant le Cobalt-60 ( $^{60}\text{Co}$ ) en tant qu'émetteur de rayons gamma.

Les bactéries furent ensuite isolées du milieu liquide par centrifugation à  $600\times g$  pendant 10 minutes. Les surnageants de cultures furent filtrés à travers un filtre de  $0,22\ \mu\text{m}$  afin d'éliminer tout résidu cellulaire et furent conservés à  $-20^\circ\text{C}$ . Les culots contenant les bactéries irradiées furent lavés deux fois dans du PBS (pH=7.0) puis resuspendus dans un volume permettant d'obtenir une concentration finale de  $10^9$  bactéries par millilitre. Les suspensions bactériennes furent aliquotées et congelées à  $-80^\circ\text{C}$  avant usage dans le protocole de stimulation.

Pour le protocole de gavage de souris, les bactéries furent obtenues sous forme de poudre contenant des agents cryoprotectants, tel qu'offert par l'Institut Rosell-Lallemand (Montréal, Qc, Canada). Les espèces *Lactobacillus acidophilus* R052, *Lactobacillus lactis* R0187 et *Streptococcus thermophilus* R083 furent utilisées en combinaison dans l'expérience. À partir du nombre de bactéries viables par gramme de produit, tel que spécifié par le fournisseur, une quantité de poudre de chaque produit fut mélangée dans de l'eau distillée afin d'obtenir  $3,3\times 10^8$  CFU/mL pour chaque espèce, donc  $10^9$  CFU/mL au total. Une solution contrôle fut préparée en mélangeant les mêmes quantités d'ingrédients que ceux utilisés dans la formule cryoprotectante de Rosell, mais sans le principe actif (la bactérie). Cette solution fut conçue par souci d'équivalence de l'apport calorique entre les groupes expérimentaux lors du gavage.

## 2 Souris

Les souris utilisées lors des protocoles *in vitro* étaient de souche C57BL/6 et BALB/c, de sexe femelle et âgées de 2 mois. Les souris utilisées lors du protocole *in vivo* étaient de souche C57BL/6, de sexe mâle et âgées de 3 mois. Toutes les souris furent obtenues de Charles Rivers Canada (St-Constant, QC, Canada) et étaient certifiées libres de pathogènes spécifiques (SPF). Elles furent logées cinq par cage dans nos installations,

nourries *ad libitum* et soumises à un cycle jour/nuit de 24 heures. Les souris furent sacrifiées par dislocation cervicale et leur rate fut prélevée de manière aseptique.

### 3 Préparation de cellules spléniques

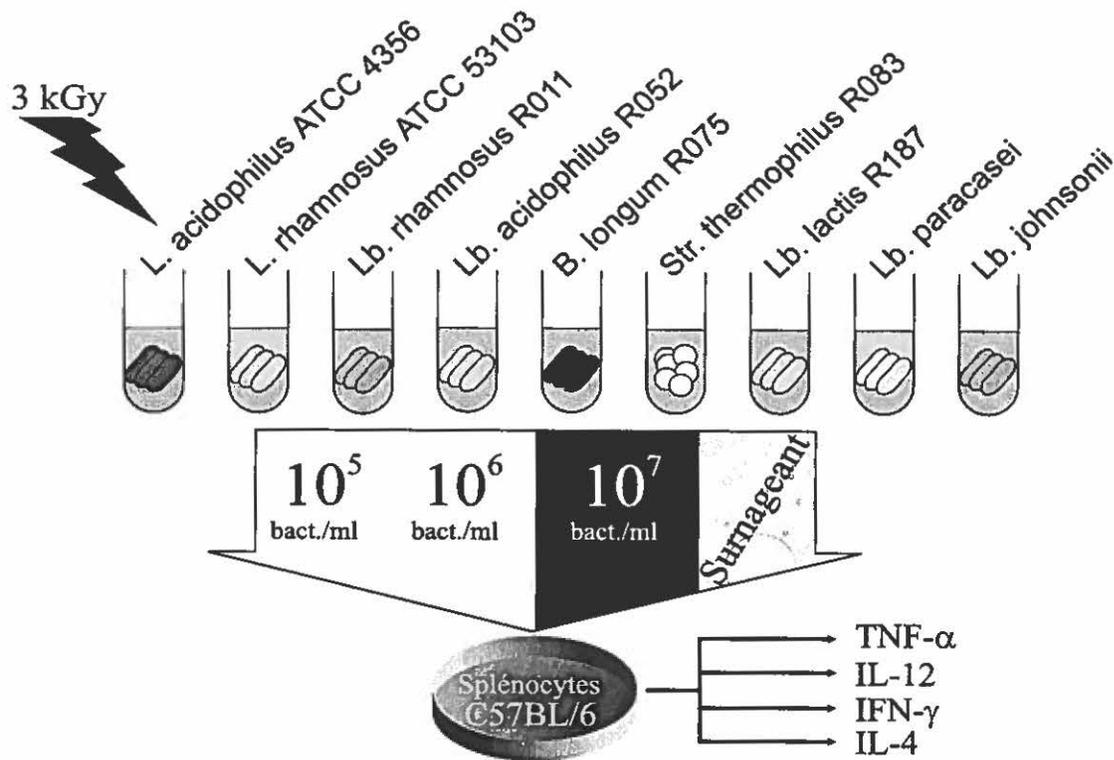
Les rates furent triturées délicatement à l'aide de pinces afin de libérer les cellules spléniques de leur enveloppe. Les cellules furent recueillies dans des tubes stériles de 45 mL en polypropylène (Starstedt) et suspendues dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec de la glutamine, du tampon HEPES et de la gentamycine (RPMI "complet")<sup>1</sup>. La suspension fut centrifugée à 520×g pendant 7 minutes, puis le surnageant fut jeté et le culot fut soumis à un choc osmotique. Deux mL d'eau traitée au DEPC par rate furent ajoutés et le tout fut vortexé pendant 25 secondes. La suspension cellulaire débarrassée des érythrocytes fut complétée à 5 fois son volume avec du milieu RPMI complet. Elle fut centrifugée de nouveau à 520×g pendant 7 minutes et le culot fut repris dans 5 mL de RPMI enrichi de 10% de sérum de veau foetal décomplémenté (SVF) à 37°C. Un échantillon dilué de cette suspension fut utilisée pour effectuer un comptage cellulaire viable sous l'hématimètre en utilisant la méthode de l'exclusion au Trypan bleu. La suspension de splénocytes fut ajustée à 5×10<sup>6</sup> cellules/mL. Les splénocytes mixtes furent distribués dans des plateaux de 24 puits à raison de 1 mL par puits et laissés en culture pour la nuit préalablement à une expérience de stimulation.

### 4 Stimulation de cellules spléniques

Les expériences de stimulation furent réalisées en groupes selon la concentration (10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> ou 10<sup>7</sup> bactéries par mL) et la cinétique (6h ou 24h d'incubation). Un schéma intégrant les différentes variables de ces expériences est représenté sur la figure 7. Dans chaque expérience, des splénocytes furent stimulés en triplicata (trois puits contenant 1 mL de suspension) avec chacune des 9 souches ou espèces de bactéries lactiques, à une concentration donnée, seules ou en combinaison. Chaque expérience fut répétée 2-3 fois. Une expérience utilisa les surnageants de cultures bactériennes (1% vol./vol.) en tant

---

1. Sauf exception mentionnée, tous les réactifs et matériels utilisés pour la culture cellulaire furent obtenus de Life Technologies, Burlington, ON, Canada



**Figure 7:** Diagramme montrant les différentes étapes du protocole *in vitro* de criblage des bactéries lactiques.

qu'agents modulateurs. De la ConA (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Sigma, St-Louis, MO, USA), un mitogène et activateur polyclonal de lymphocytes, et du lipopolysaccharide (LPS, 100  $\text{ng}/\text{mL}$ , lot# 87114062, Sigma), un activateur de phagocytes, furent utilisés en tant que contrôle positif. Des puits auxquels rien n'a été ajouté firent figure de contrôles négatifs. Les plateaux furent incubés pendant 6 h ou 24 h à 37°C dans une atmosphère à 5% de  $\text{CO}_2$  saturée en humidité.

À la fin de la période d'incubation, les cellules furent resuspendues dans leur puits à l'aide d'un racloir stérile flexible. Les suspensions cellulaires en triplicata furent par la suite rassemblées dans des tubes stériles de 15mL en polypropylène. Les suspensions furent centrifugées à  $520 \times g$  pendant 7 minutes à 4°C puis les culots furent congelés à -80°C en attente de l'extraction de l'ARN. Les surnageants furent aliquotés et conservés à -20°C ou bien analysés directement pour leurs taux de cytokines en solution.

## 5 Dosage des cytokines

### 5.1 Dosage du TNF par bioessai

Nous avons évalué la quantité de TNF bioactif dans le milieu en utilisant la lignée de fibroblastes de souris L929. Ces cellules sont sensibles à l'action cytotoxique du TNF, et leur taux de survie est inversement proportionnel à la concentration de TNF biologiquement actif dans le milieu, à l'intérieur d'un large intervalle de concentrations (Fisch et Gifford, 1983). Ces cellules étaient maintenues en culture dans du RPMI 1640 complet + 5% SVF. Elles étaient décollées du plastique du flacon avec de la trypsine (5000 U/mL) incubées 1 min 30 sec à 37°C. Un comptage cellulaire était effectué pour le bioessai afin de préparer une suspension de  $3,3 \times 10^5$  cellules/mL dans du RPMI complet + 5% SVF.

Cette suspension était distribuée dans un plateau de 96 puits à raison de 75 µL par puit, excepté la première colonne utilisée comme témoin vide. Après 24 heures d'incubation à 37°C, 25 mL d'actinomycine D (Roche) à 2 µg/mL fut ajouté à chaque puits sauf ceux de la colonne 2 (contrôle actinomycine<sup>1</sup>) afin d'arrêter la croissance cellulaire. Ensuite, nous faisons des dilutions successives (1:2) des surnageants à analyser, en triplicata, soit 100 µL de surnageant de départ à diluer en série dans 8 rangées. Rien n'était ajouté à la rangée 3 (contrôle positif<sup>2</sup>). Les plaques étaient ensuite incubées à 37°C + 5% CO<sub>2</sub> pendant 16-20 heures. Après cette période, le milieu liquide était retiré et les cellules étaient fixées avec de la formaldéhyde 5%, 100 µL/puits pendant 5 minutes. Les plaques étaient ensuite vidées et rincées à l'eau courante 3 fois. Par la suite, les cellules fixées étaient colorées au crystal violet (50 µL/puits) pendant cinq minutes, après quoi elles étaient rincées à nouveau 3 fois pour retirer tout excès de colorant. Après un séchage complet des plaques, 100 µL d'acide acétique 33% était ajouté à chaque puits afin de dissoudre les pigments. L'absorbance était lue à 540 nm dans un lecteur de plaques (Esay Reader EAR 400 AT, SLT-Instruments, Grödig, Autriche), en utilisant la colonne 1 comme référence.

---

1. Ceci permet de s'assurer que les cellules se divisaient dans les plaques.

2. Représentant le nombre maximum de cellules, donc une cytotoxicité nulle.

Dans ce test, une unité de TNF correspond à l'inverse du facteur de dilution donnant 50% de cytotoxicité. Afin de calculer le pourcentage de cytotoxicité pour chaque échantillon, l'équation suivante fut utilisée.

$$\% \text{ cytotoxicité} = \frac{\text{D.O. échantillon}}{\text{D.O. positif}} \times 100$$

La D.O. (densité optique) de l'échantillon est la moyenne des absorbances des trois puits lus pour une dilution. La D.O. du contrôle positif est la moyenne des puits de la colonne 3, qui n'avaient pas été incubés en présence de surnageant. Un % de cytotoxicité est calculé pour chaque dilution. Une droite à régression linéaire est tracée pour les dilutions d'un échantillon ( $x$  = facteur de dilution,  $y$  = % de cytotoxicité) et le point 50% est trouvé à l'aide de l'équation de la droite. L'inverse de la dilution ( $2^x$ ) équivaut au nombre d'unité de TNF dans l'échantillon initial non dilué. Les résultats furent exprimés soit en U/mL, soit en pourcentage du contrôle positif obtenu après stimulation avec le LPS (100  $\mu\text{g/mL}$ ).

## 5.2 Dosage de l'IFN- $\gamma$ par bioessai

La quantification de l'IFN- $\gamma$  était effectuée tel que détaillé par Migliorini *et al.* (1991), avec des modifications mineures. La lignée de macrophages murins RAW 267.4 a été utilisée dans ce test comme cellules indicatrices. Les macrophages mis en présence de LPS et d'IFN- $\gamma$  synthétisent de grandes quantités de NO par le biais de l'iNOs (NO-synthase inductible) qui utilise la L-arginine comme substrat. La nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) en est un dérivé stable détectable par la réaction de Griess. L'IFN- $\gamma$  bioactif peut entrer en synergie avec une quantité sub-optimale de LPS et induire la production de NO de façon hautement spécifique et dose-dépendante chez un macrophage différencié. Ce bioessai exploite ce phénomène.

Les cellules RAW 264.7 sont maintenues dans du RPMI 1640 complet + 10% SVF et récoltées pour l'expérience avec un racloir en plastique flexible. Elles sont comptées et suspendues dans du RPMI complet + 5% SVF à une concentration de  $2 \times 10^5$  cellules/mL.

Cette suspension est distribuée dans un plateau de 96 puits (100  $\mu$ l/puits) et incubée pendant 18 heures à 37°C + 5% CO<sub>2</sub>. Par la suite, les puits sont vidés et 50  $\mu$ L d'échantillon plus 50  $\mu$ L de LPS (20 ng/mL dans du RPMI 5%) sont ajoutés en triplicata à la monocouche de cellules RAW 264.7. Un échantillon négatif (50  $\mu$ L de milieu plus 50  $\mu$ L de LPS) fut inclus dans chaque test afin de connaître la production spontanée de NO par les RAW 264.7 en réponse au LPS. Après 24 heures d'incubation, 50  $\mu$ L des surnageants de RAW 264.7 de chaque puits sont prélevés et transférés dans une nouvelle plaque non-stérile. 50  $\mu$ L de milieu seul est ajouté à la colonne 1, et un échelle de NaNO<sub>2</sub> est montée dans les colonnes 10-12 par dilution en série dans du RPMI + 5% SVF d'une solution initiale de 400  $\mu$ M.

La concentration de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> dans le milieu est alors mesurée par le test colorimétrique de Griess. Cinquante  $\mu$ L du "Réactif de Griess" (des quantités égales des solutions suivantes: déshydrochlorure de diamine naphthylethylène 0.1% dans H<sub>2</sub>O et sulphanilamide 1% dans H<sub>2</sub>O + 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) sont ajoutés à chaque puits. L'absorbance est lue 5 minutes plus tard à 540 nm dans un lecteur de plaques. À partir de l'échelle, une courbe standard est obtenue, et les concentrations de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> dans les divers échantillons peuvent être calculées à partir des moyenne des absorbances des puits en triplicata. De cette concentration est soustraite celle du contrôle LPS négatif qui représente la production non spécifique de NO par les cellules RAW 264.7. La quantité d'IFN- $\gamma$  bioactif dans le milieu peut être exprimée soit en mM de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, soit en pourcentage du contrôle positif obtenu après stimulation avec la ConA (5  $\mu$ g/mL).

Afin de valider cette technique, une expérience contrôle fut effectuée dans laquelle 10 $\mu$ g/mL d'un anticorps monoclonal de rat anti-IFN- $\gamma$  de souris (PharMingen Canada, ON, Canada; clone XMG1.2) fut ajouté à la réaction en même temps que les échantillons. L'anticorps s'est avéré capable d'inhiber la production de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> dans les conditions décrites plus haut.

### **5.3 Dosage de l'IL-12p40 par ELISA**

Une trousse ELISA commerciale mesurant l'IL-12p40 murine fut obtenue et utilisée tel que spécifié par le manufacturier (Quantikine M-Murine IL-12 p40 ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Cette trousse utilise la technique de l'immunoessai enzymatique sandwich quantitatif. Des microplaques de 96 puits étaient recouvertes d'anticorps monoclonaux spécifiques pour l'IL-12p40. Les témoins, standards et échantillons furent ajoutés aux puits (en duplicata) et l'IL-12p40 en solution se lia aux anticorps immobilisés. Après lavage, un anticorps polyclonal spécifique pour l'IL-12p40 murine et lié à une enzyme (peroxydase de raifort) fut ajouté. À la suite d'un autre lavage pour enlever toute enzyme non liée, une solution contenant le substrat enzymatique fut ajouté aux puits. La réaction enzymatique donne un produit bleu qui devient jaune lorsque la solution d'arrêt est ajoutée. L'intensité de la coloration telle que lue à 450 nm dans un lecteur de plaque fut comparée à la courbe standard et une valeur quantitative en pg/mL fut obtenue pour chaque échantillon.

## **6 RT-PCR de gènes de cytokines**

### **6.1 Extraction de l'ARN et génération de l'ADNc**

L'ARN total des cellules spléniques préalablement stimulées fut extrait et purifié en utilisant la trousse High Pure RNA de Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA), tel qu'indiqué par le manufacturier. L'ARN obtenu, dépourvu d'ADN ou de protéines, fut aliquoté et congelé à -80°C ou bien utilisé directement pour la réaction de transcription inverse, afin de générer les ADN complémentaires.

Pour chaque échantillon, 10 µL d'ARN dans un tube eppendorf stérile furent chauffés à 70°C pendant 5 minutes puis refroidis 3 minutes sur glace, afin de dissocier les structures secondaires et tertiaires des molécules d'ARN. À chaque tube fut ajouté 3 µL d'H<sub>2</sub>O stérile, 2 µL de tampon RT 10X (Pharmacia-Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada), 2 µL de l'inhibiteur de RNase RNAGuard™ 28,9 U/µL (Pharmacia), 2 µL de dNTPs à 10 mM (un mélange équimolaire de dATP, dGTP, dTTP et dCTP), 2 µL d'oligo dT 40 pmol (Roche), et 2 µL de transcriptase inverse du MoMuLV à 15,6 U/µL (Pharmacia). La

réaction se déroula pendant 1h30 à 37°C, après quoi les tubes furent chauffés 5 minutes à 94°C pour dénaturer les ARNs restants. Les produits de RT furent conservés à -20°C pour usage dans les réactions de PCR semi-quantitatifs de cytokines.

Toutes les manipulations décrites dans cette section furent exécutées dans des conditions stériles afin d'éviter toute contamination pouvant être source de RNases. De plus, un échantillon ne contenant que 10 µL d'H<sub>2</sub>O DEPC fut inclus dans la réaction de RT pour chaque série d'échantillons

## 6.2 PCR semi-quantitatif

Les transcrits des gènes de cytokines furent amplifiés par la réaction de polymérase en chaîne (PCR) dans le but de visualiser l'expression relative des ces gènes par rapport à un gène d'expression constitutive ("housekeeping gene"). Le tableau V énumère les oligonucléotides utilisés comme amorces pour les réaction de PCR; il stipule le transcrit ciblé, la séquence des amorces (sens et antisens) et la publication où a été puisée l'information. Le gène de la GAPDH (glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase) fut utilisé comme gène de référence. Toutes les amorces furent synthétisées dans nos installations par le personnel du Dr. François Sharek (INRS - Institut Armand-Frappier - Centre de Recherche en Microbiologie Appliquée).

Un tube de réaction PCR de 500 µL (Ultident) contenait pour la phase un: 21 µL d'H<sub>2</sub>O stérile traitée au DEPC, 5 µL de tampon PCR 10X (Pharmacia), 1 µL de chaque amorce à une concentration de 20 pmol/µL, 1 µL de dNTPs à 10 mM et 5 µL des ADNcs à amplifier. Tous les tubes furent gardés sur glace au cours la préparation. La deuxième phase consistait à ajouter à chaque tube 0.25 µL de Taq polymérase 5 U/µL (Pharmacia) dilué dans 15.75 µl d'H<sub>2</sub>O stérile.

Les tubes furent insérés dans un thermocycleur programmable à couvercle chauffant (Techne Genius, Techne, Cambridge, UK). La réaction de PCR commençait par une étape de dénaturation à 95°C pendant 2 minutes, suivie d'une série de cycles consistant en une dénaturation de 30 secondes à 95°C, un temps d'appariement à 60°C

pendant 1 minute et une période d'élongation du brin d'ADN d'une minute à 72°C. Après le dernier cycle, un temps d'extension finale de 7 minutes à 72°C était accordé, suivi d'un refroidissement jusqu'à 4°C.

Le contrôle H<sub>2</sub>O de RT fut soumis aux mêmes réactions que les autres échantillons, afin de s'assurer qu'aucun contaminant ne se soit introduit dans les réactions de RT-PCR.

Vu la quantité initiale variable de transcrits, le nombre de cycle fut ajusté selon le gène à amplifier, basé sur des tests préalables visant à obtenir une lecture optimale en évitant de saturer la réaction. Pour les gènes du TNF, de l'IL-4 et de l'IFN- $\gamma$ , 35 cycles de PCR furent accomplis; 40 pour l'IL-12p40; 25 pour la GAPDH.

Gène	Séquence	Référence
<b>GAPDH (+)</b>	5' CCTTCATTGACCTCAACTACAT 3'	Daher <i>et al.</i> , 1997
(-)	5' CCAAAGTTGTCATGGATGACC 3'	
<b>IFN-<math>\gamma</math> (+)</b>	5' CAAGTGGCATAGATGTGGAA 3'	Colle <i>et al.</i> , 1997
(-)	5' CTGGACCTGTGGGTTGTT 3'	
<b>IL-4 (+)</b>	5' GAGCCATATCCACGGATGCGACAA 3'	Colle <i>et al.</i> , 1997
(-)	5' CATGGTGGCTCAAGTACTACGAGTA 3'	
<b>TNF (+)</b>	5' CAGCCTCTTCTCATTCTGC 3'	Daher <i>et al.</i> , 1997
(-)	5' GACAAGGTACAACCCATCGG 3'	
<b>IL-12p40 (+)</b>	5' CTGCCACAAAGGAGGCGAAGACCTC 3'	Colle <i>et al.</i> , 1997
(-)	5' CATATTTTATTCTGCTGCCGTGCTTC 3'	

**Tableau V:** Liste des amorces utilisées pour le RT-PCR.

Les produits d'amplification obtenus furent analysés sur gel d'agarose 2%. Les différents échantillons furent migrés sur gel à 100 volts dans un tampon TBE pendant environ une heure. Les bandes furent ensuite colorées dans une solution de bromure d'éthide à 0.5  $\mu$ g/mL pendant 15 minutes puis le gel fut trempé dans de l'eau distillée pendant 20 minutes pour enlever le colorant non fixé. Le gel a été par la suite

photographié sous rayons ultraviolets et une image numérique des bandes révélées fut capturée et analysée à l'aide d'un densitomètre (Biorad, modèle GS-670).

L'image du gel fut analysée avec le programme Molecular Analyst (Biorad Laboratories). Pour un gel donné, la région de l'image (rectangle) tracée pour chaque bande était la même. La valeur de densité moyenne des bandes (moyenne des comptages de luminosité/mm<sup>2</sup>) fut obtenue et le rapport de la densité de la bande en question sur la densité de la bande de GAPDH correspondante fut calculée. Afin de normaliser le bruit de fond des gels, une région élargie dépourvue de bande fut utilisée comme témoin négatif et sa valeur fut soustraite des densités de chaque bande dans la même image. La valeur semi-quantitative d'expression du gène fut exprimé à partir du rapport gène/GAPDH, puis en pourcentage vis à vis du contrôle positif (LPS ou ConA).

## 7 Étude de modulation de l'immunité *in vivo*

Dans ce protocole, les rayons X (dose de 550 rads<sup>1</sup>) furent utilisés en tant qu'agent immunosupresseur, et la ConA en tant qu'inducteur de la production d'IFN- $\gamma$ . L'irradiation fut effectuée à l'aide d'un générateur de rayons X de type industriel (Phillips Electronics Ltd, model MCN 165) préalablement calibré et en bon état de fonctionnement. Le générateur fut opéré dans des conditions garantissant un faisceau stable et homogène: voltage de 160 kV, ampérage de 18 mA, filtration ajoutée de 0,5 mm de cuivre et 1,0 mm d'aluminium. Les souris furent irradiées à l'intérieur de cages en plastique propres, à une distance de 77,5 cm de la source, pendant 22 minutes, après quoi elles furent retournées dans leur cages respectives à l'animalerie.

Une étude préliminaire fut accomplie afin d'identifier les dosages optimaux permettant de déceler des différences significatives entre les groupes expérimentaux. Deux millions de splénocytes de souris 2, 4 et 6 jours post-irradiation, furent stimulés avec des doses 1  $\mu$ g, 2  $\mu$ g et 3  $\mu$ g de ConA, dans un volume de 1 mL. Des splénocytes de

---

1. La dose de 550 rads est considérée comme immunosuppressive mais non létale (Daher *et al.*, 1997). Des essais préliminaires ont montré une récupération presque complète des paramètres immunitaires après 2-3 semaines chez les C57Bl/6.

souris n'ayant pas été irradiés étaient utilisés comme base de comparaison. La combinaison 6 jours et 3 µg ConA fut identifiée comme optimale pour le protocole.

Des souris C57Bl/6 furent réparties de façon aléatoires en 3 groupes: 4 souris témoins non traitées (NT), 6 souris gavées avec un mélange de bactéries viables (B) et 6 souris gavées avec une solution contrôle (C). On administra quotidiennement aux souris par gavage un millilitre de l'un des mélanges à l'aide d'un cathéter oesophagial. Après 6 jours, les souris gavées (B et C) furent soumises à une dose de rayons X de 550 rads. Elles furent par la suite gavées pendant 6 jours supplémentaires, après quoi on les sacrifia et leur rate fut prélevée. Les souris non traitées furent sacrifiées et disséquées au même moment.

Les splénocytes furent isolés et mis en culture dans des plateaux de 24 puits. Un puits contenait, dans 1 mL,  $2 \times 10^6$  splénocytes provenant d'une seule souris. Les cellules furent incubées avec 3 µg/mL de ConA pendant 24 heures. Nous avons finalement prélevé les surnageants et mesuré par bioessai les concentrations d'IFN- $\gamma$  bioactif.

## 8 Statistiques

Afin de déceler les différences significatives entre résultats obtenus sous différents paramètres, nous avons comparé les données l'aide du test t de Student. La valeur  $p$  correspond à la donnée alpha du test, représentant la probabilité d'une erreur de type I (rejet d'une hypothèse vraie, l'hypothèse étant ici que les deux échantillons proviennent de la même population avec la même moyenne). Un  $p$  inférieur à 0.05 indique une différence significative entre deux groupes expérimentaux ou entre un groupe expérimental et le groupe témoin.

Pour les expériences multiples, les écarts-types entre les expériences ont été calculés et inclus dans les graphiques. Pour les expériences simples, les écart-types entre les différentes mesures effectuées ont également été calculées et mises sous forme graphique.

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

### 1 Criblage et étude comparative

#### 1.1 Expression du gène du TNF

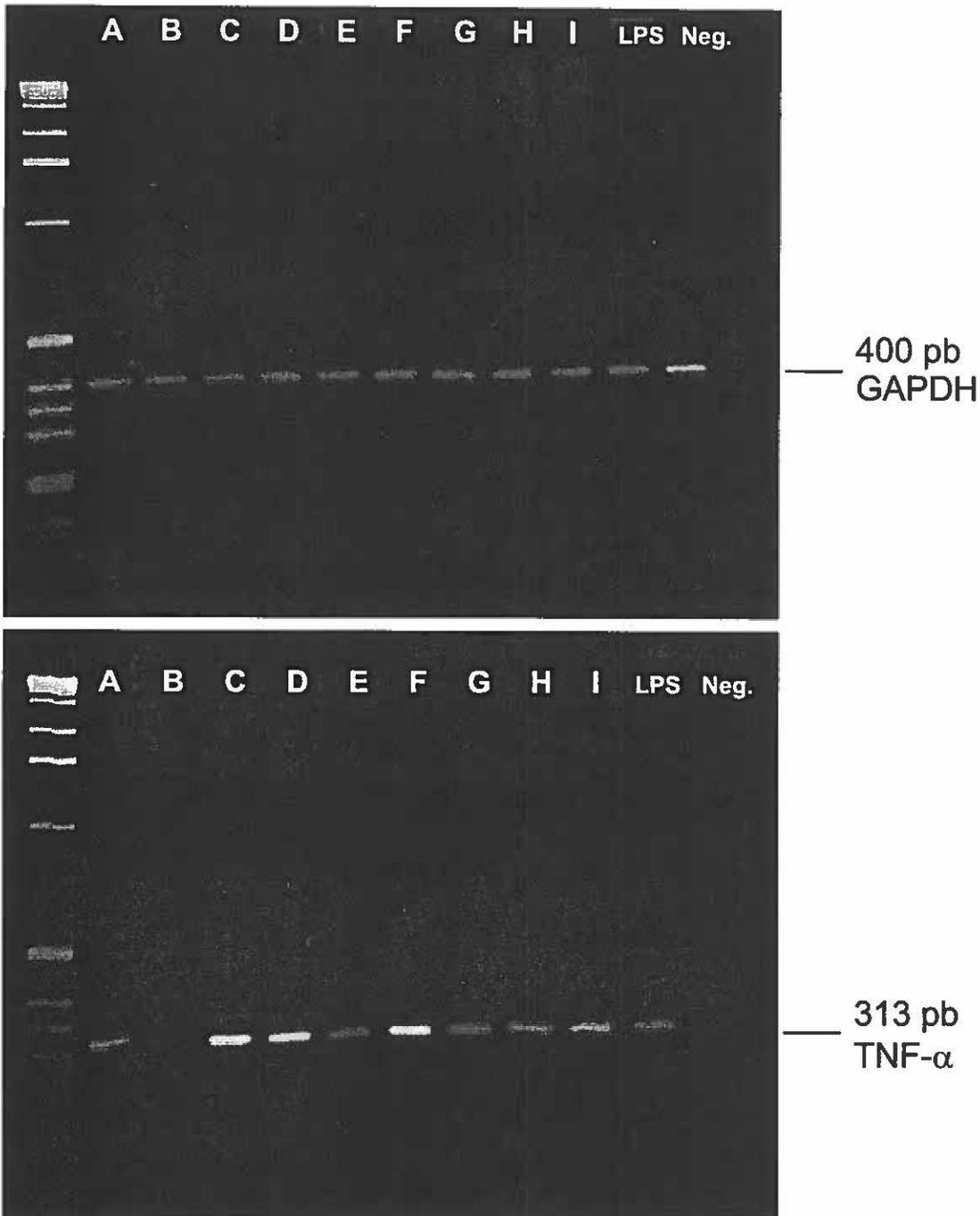
Les valeurs obtenues pour chaque échantillon furent calculées à partir des densités relatives des bandes de GAPDH et de TNF tel que révélées sur gel d'agarose. Une photographie d'un tel gel est présentée à titre d'exemple dans la figure 8. Le tableau VI montre les densités de chaque bande, les rapports gène / GAPDH, et les pourcentages par rapport au témoin LPS. Cette dernière série de valeurs fut utilisée pour tracer des graphiques montrant les expressions relatives de TNF pour toutes les bactéries, à toutes les concentrations, après 6 heures d'incubation avec des splénocytes murins (figure 9).

À partir de ce graphique nous constatons premièrement un absence totale d'expression du gène du TNF lorsque les bactéries furent administrées à une concentration de  $10^5$  bactéries/mL. À  $10^6$  UFC/mL l'expression est réduite mais détectable; des bactéries comme *S. thermophilus* et *L. acidophilus* R052 se démarquent des autres. C'est à un titre de  $10^7$  que nous observons les réponses les plus élevées et les différences les plus marquées. La plupart des bactéries sont actives à cette concentration, mais certaines, telles *S. thermophilus*, *L. johnsonii* et *L. rhamnosus* 53103, ont une activité inductrice remarquable, largement supérieure à l'action du LPS (450% à 700%).

#### 1.2 Sécrétion de TNF bioactif

La quantité de TNF actif produit par les splénocytes dans le surnageant de culture fut mesurée par bioessai après 6 heures d'incubation. Le graphique présenté dans la figure 10 illustre toutes les données recueillies, toujours échelonnées par rapport au contrôle positif (LPS).

Dans le cas présent, la sécrétion du TNF suit d'assez près l'expression de son gène lorsque les cellules sont stimulées par des bactéries lactiques. Sa production est nulle en présence de  $10^5$  UFC/mL et basse à  $10^6$  UFC/mL. Encore une fois, *S. thermophilus* se

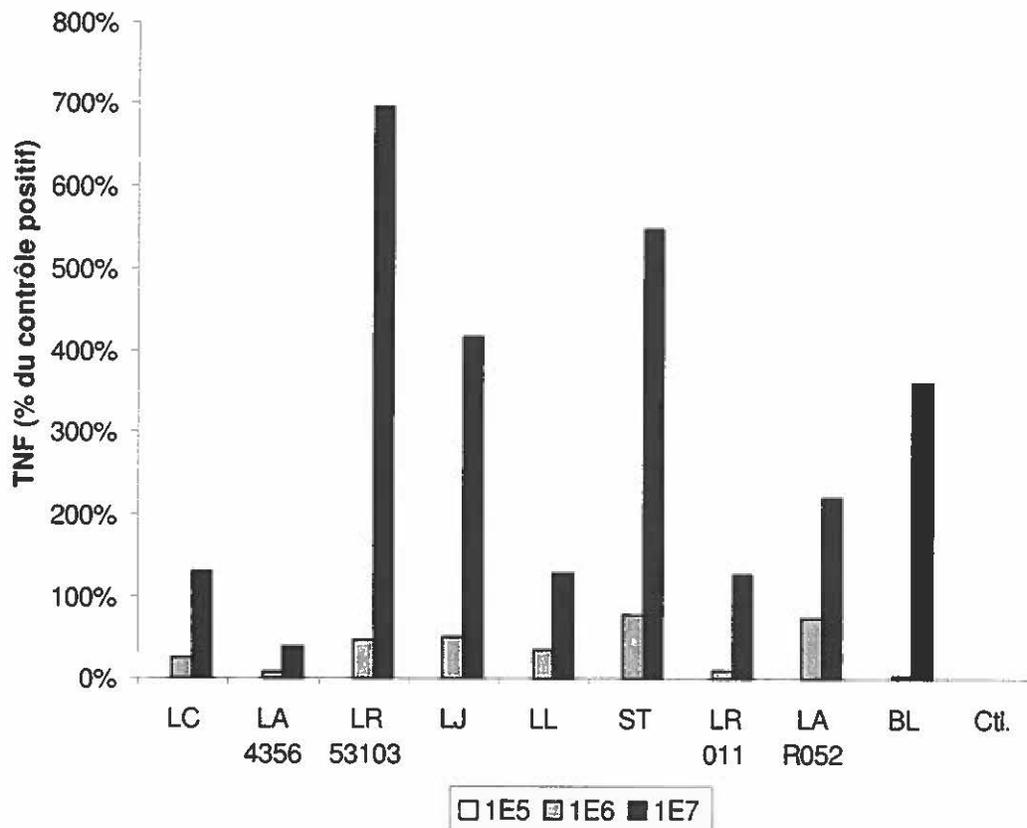


**Figure 8:** Exemples d'électrophorèse sur gel d'agarose de produits d'amplification par PCR représentant les ARNm des gènes de la GAPDH et du TNF. Les gels d'agarose (2%) furent colorés au bromure d'éthide (0.5 $\mu$ g/mL) et photographiés sous exposition UV dans un densitomètre Biorad. Les puits contenaient une échelle de marqueurs de poids moléculaires de 1 Kb (puits de gauche), les produits de RT-PCR pour chaque bactérie testée (A-I), le contrôle positif (LPS) et le contrôle non stimulé. Les bandes de 400 pb correspondent à l'ARNm de la GAPDH. Les bandes de 313 pb sont celles de l'ARNm du TNF. Voir le tableau VI pour la liste des bactéries utilisées.

Échantillon	TNF (Densité /mm <sup>2</sup> )	GAPDH (Densité / mm <sup>2</sup> )	Rapport sur la GAPDH	% LPS
A - <i>L. paracasei</i>	6973.4	16829	0.414	25%
B - <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	1235.8	8817.8	0.140	8%
C - <i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	6549.8	8150.6	0.804	48%
D - <i>L. johnsonii</i>	9108.1	10600.6	0.859	51%
E - <i>L. lactis</i> R187	7082.9	11972.4	0.592	35%
F - <i>S. thermophilus</i> R083	15244.1	11451.5	1.331	79%
G - <i>L. rhamnosus</i> R011	2564.9	16215.3	0.158	9%
H - <i>L. acidophilus</i> R052	15137.4	12172.2	1.244	74%
I - <i>B. longum</i> R075	671.4	12813.1	0.052	3%
LPS	18508.3	10970.3	1.687	100%
Négatif	283.5	19558.9	0.014	1%

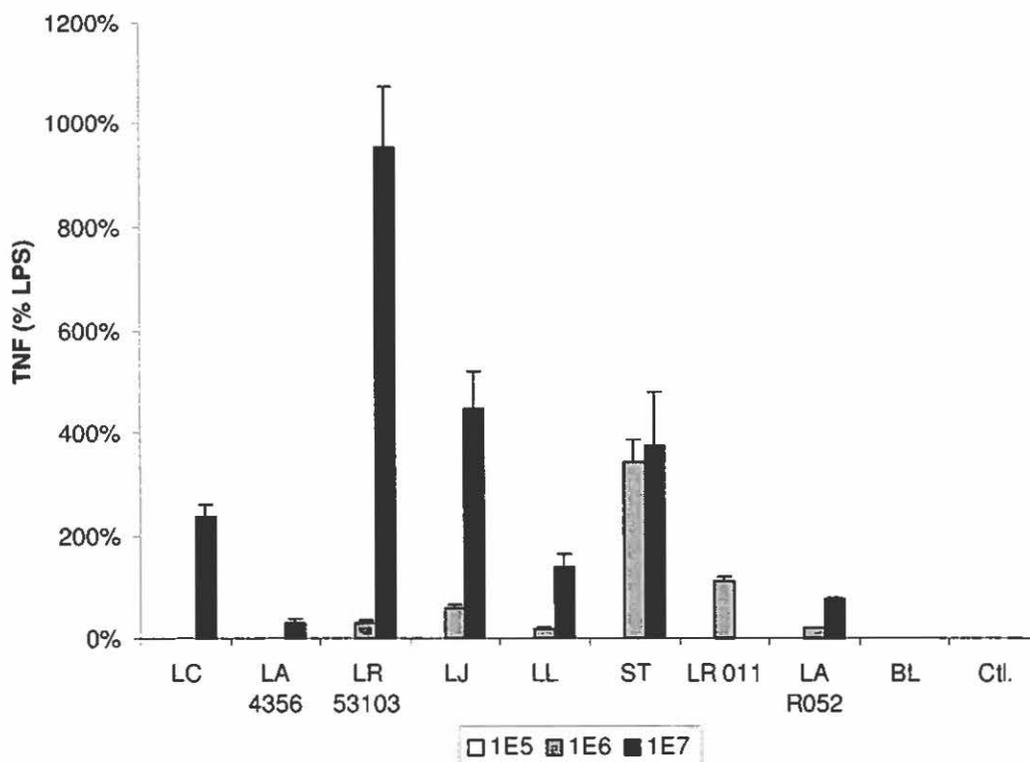
**Tableau VI:** Exemples de données densitométriques utilisées pour l'étude semi-quantitative d'expression de gènes de cytokines.

Chaque rangée correspond à un puits de gel d'électrophorèse des produits de PCR du TNF et de la GAPDH. 10<sup>6</sup> UFC/mL (6 h) ont été utilisés dans l'expérience présentée. La densité des bandes a été calculée par analyse d'images numériques. Chaque densité de TNF fut normalisée par rapport à la densité de la bande de GAPDH obtenue à partir des mêmes ADNc. Finalement, l'intensité de l'expression du TNF en réponse aux bactéries fut comparée à celle produite en réponse au LPS (100 ng/mL).



**Figure 9:** Expression du gène du TNF par des splénocytes de souris C57BL/6 cultivés en présence de bactéries lactiques.

Les cellules spléniques ont été mises en culture pendant 6 heures dans du RPMI + 10% SVF en présence de  $10^5$  (barres blanches, résultats tous nuls),  $10^6$  (barres rayées) et  $10^7$  UFC/mL (barres noires). Les contrôles négatifs ne contenaient pas de bactéries. Les contrôles positifs ont reçu 100 ng/mL de LPS. L'ARN des cellules fut extrait et les transcrits de cytokines furent amplifiés par RT-PCR pour être analysés par densitométrie après électrophorèse sur gel d'agarose, et ramenées en rapport sur l'expression de la GAPDH. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle positif (LPS). 100% (1E5) = 1,8; 100% (1E6) = 1,7; 100% (1E7) = 0,6. **LC:** *Lactobacillus paracasei* C1; **LA 4356:** *L. acidophilus* ATCC 4356; **LR 53103:** *L. rhamnosus* ATCC 53103; **LJ:** *L. johnsonii* C4; **LL:** *L. delbrueckii ssp. lactis* R187; **ST:** *Streptococcus termophilus* R083; **LR 011:** *L. rhamnosus* R011; **LA R052:** *L. acidophilus* R052; **BL:** *Bifidobacterium longum* R075; **Ctl.:** Contrôle négatif.



**Figure 10:** Sécrétion de TNF bioactif par des splénocytes cultivés en présence de bactéries lactiques.

Les cellules spléniques furent cultivées tel que décrit dans la figure 9. Les surnageants furent prélevés après 6 heures d'incubation et congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment du dosage de TNF. Un bioessai mesurant l'effet cytotoxique du TNF sur les cellules de la lignée L929 a été exécuté pour chaque échantillon. Les quantités de TNF, exprimées en unités arbitraires, ont été comparées à la production de TNF en réponse au LPS (contrôle positif, 100% dans l'échelle du graphique). 100% (1E5) = 76 U/ml; 100% (1E6) = 116 U/ml; 100% (1E7) = 67 U/ml. Les résultats sont ceux obtenus à partir d'une expérience par série de valeurs et sont représentatifs de deux expériences indépendantes. Les barres verticales représentent les écarts-types calculés sur les dosages réalisés en triplicata.

démarque des autres à une concentration de  $10^6$  UFC/mL. À haute concentration ( $10^7$ ), les bactéries qui induisaient le plus l'expression du gène (*L. rhamnosus* 53103, *S. thermophilus* et *L. johnsonii*) sont également les plus efficaces pour induire la sécrétion de TNF. Fait intéressant, les bactéries *L. rhamnosus* R011, *L. acidophilus* R052 et *B. longum* R075 ont peu d'action sur la sécrétion, même si elle pouvaient induire l'expression du gène à  $10^7$  UFC/mL. Un facteur limitant inconnu semblerait donc agir dans ce cas.

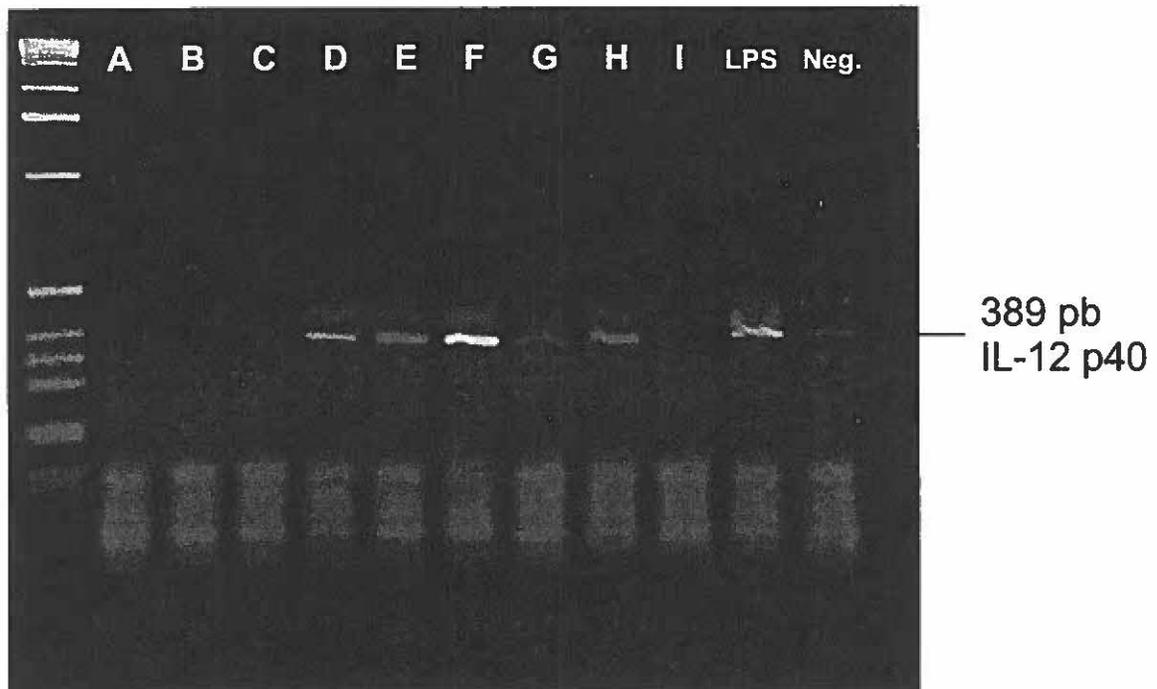
### 1.3 Expression du gène de l'IL-12p40

La technique de RT-PCR fut utilisée pour amplifier les transcrit de la sous-unité p40 de la molécule d'IL-12. L'exercice s'est avéré un échec partiel par le fait que, parmi toutes les séries d'échantillons testées, seulement une a pu être analysée sans problème. Une série impliquant les bactéries à  $10^6$  UFC/mL (6 heures) contient toutes les valeurs densitométriques recherchées, tel que montré dans les figures 11 (gel) et 12 (graphique). Les autres séries furent inadéquatement amplifiées par RT-PCR (signal bas ou absent, incluant le contrôle positif), et ne sont donc pas présentées dans ce document.

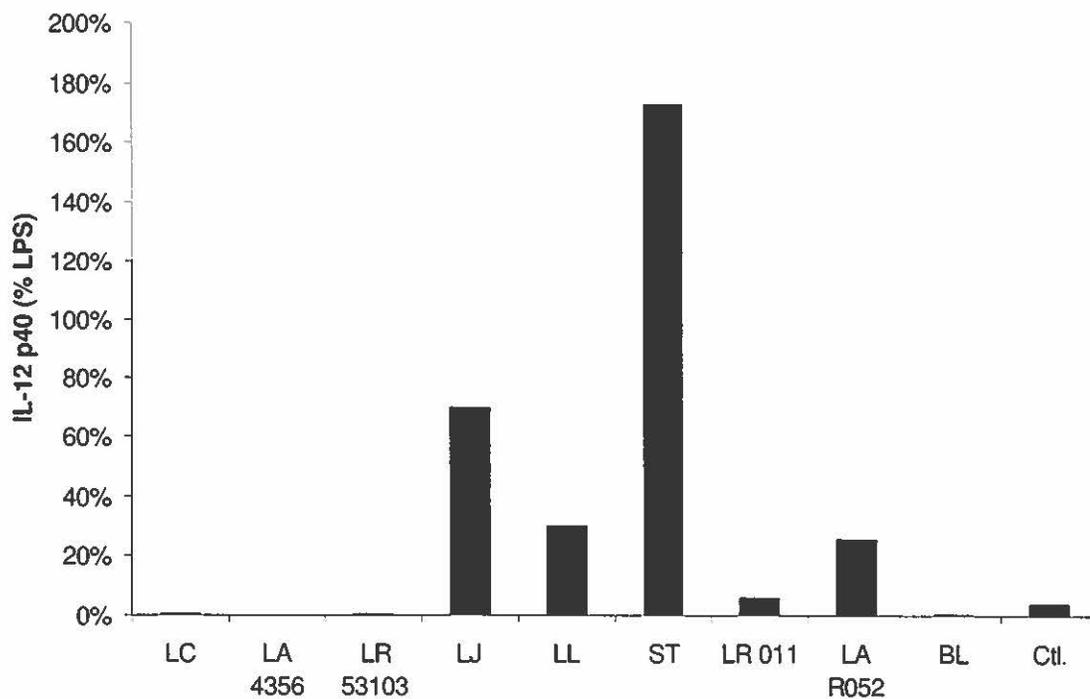
Ces résultats démontrent encore une prédominance des bactéries *S. thermophilus*, *L. lactis* et *L. johnsonii*. *L. rhamnosus* ATCC 53103 est négative dans cette expérience, alors qu'elle se démarque à la fois dans la production de TNF et d'IL-12p40 soluble (voir la section suivante). Il est donc possible que nous soyons en présence d'un faux négatif. Il fut malheureusement techniquement impossible de vérifier cette question en répétant l'expérience. Par conséquent, ces interprétations ont une valeur uniquement indicatrice et non déterminante.

### 1.4 Sécrétion d'IL-12p40

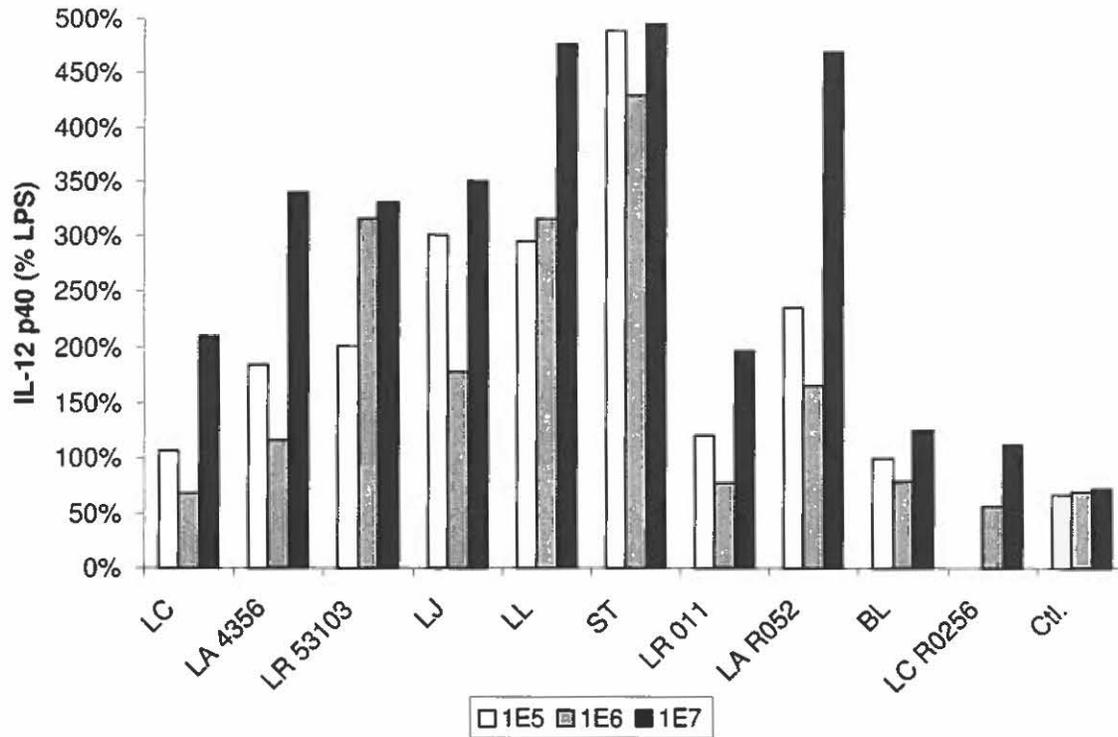
Afin de compléter les résultats de RT-PCR, une trousse ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MI) a été utilisée afin de détecter l'IL-12p40 murin dans les surnageants de culture de splénocytes (24h). La figure 13 montre sous forme graphique les données obtenues lors du test, exprimées en pourcentage du contrôle positif (LPS, 100 ng/mL). Il est à noter que le LPS ne semble pas, dans le cas présent, être un fort inducteur d'IL-12p40. Les contrôles négatifs ont tous des valeurs (~70%) qui se rapprochent de



**Figure 11:** Électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR représentant le gène de la sous-unité p40 de l'interleukine-12. Le gel fut préparé et analysé tel que décrit dans la figure 8. La bande de 389 pb correspond à l'IL-12 p40.



**Figure 12:** Expression du gène de l'IL-12 p40 par des splénocytes de souris C57BL/6 cultivés en présence de bactéries lactiques. Voir la description de la figure 9. 100% = 0,62 GAPDH



**Figure 13:** Sécrétion d'IL-12 p40 par des splénocytes de souris C57BL/6 cultivés en présence de bactéries lactiques.

Les cellules spléniques furent cultivées tel que décrit dans la figure 9. Les surnageants étaient collectés après 24 h d'incubation et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment du dosage. Les concentrations d'IL-12p40 en pg/mL ont été obtenues à partir d'un test immunoenzymatique (ELISA) spécifique à l'IL-12 p40 murine. Ces valeurs ont été converties en pourcentage du contrôle positif (LPS, 100 ng/mL, 100% dans l'échelle du graphique). 100% (1E5) = 64,1 pg/mL; 100% (1E6) = 212,93 pg/mL; 100% (1E7) = 202,7 pg/mL.

Voir le tableau VI ou la figure 9 pour la liste des abréviations. **LC R0256:** *Lactobacillus casei* R0256. Barres blanches:  $10^5$  UFC/mL; barres rayées:  $10^6$  UFC/mL; barres noires:  $10^7$  UFC/mL.

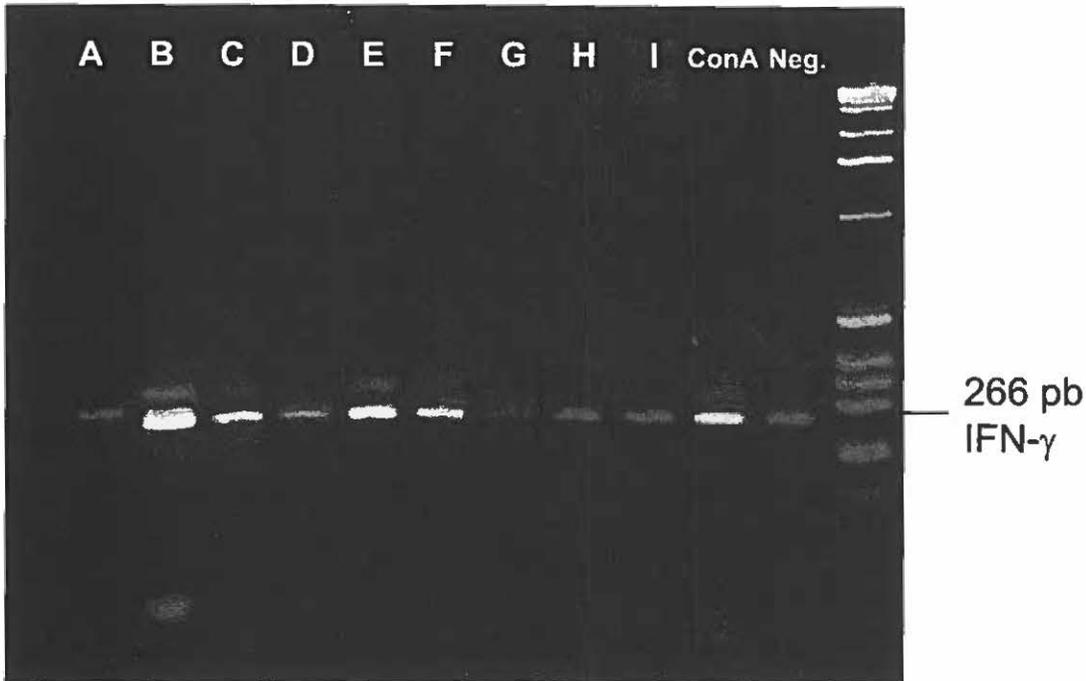
celles du LPS. Plusieurs bactéries ont néanmoins une action inductrice d'IL-12p40 remarquable, allant jusqu'à 496% du contrôle positif. Aucune bactérie n'a démontré d'action inhibitrice sur la production basale de cette cytokine. La bactérie *Lactobacillus casei* R0256, qui ne faisait pas partie intégrante du protocole, fut ajoutée aux dernières expériences à  $10^6$  et  $10^7$  UFC/mL afin d'effectuer une estimation rapide de son potentiel immunomodulateur.

Les cellules spléniques ont répondu à la présence de certaines bactéries, administrées à des concentrations basses et moyennes ( $10^5$ - $10^6$  UFC/mL), par une libération d'IL-12p40. La production d'IL-12p40 varie peu entre ces deux concentrations, mais est généralement accentuée à haute concentration ( $10^7$ ). Les bactéries qui sont négatives à basses concentrations induisent une réponse IL-12 relativement limitée à haute concentration. À l'opposé, *S. thermophilus* démontre une activité fortement inductrice à toutes les doses. *L. lactis*, *L. rhamnosus* 53103, *L. johnsonii* et *L. acidophilus* R052 se démarquent également par leur activité stimulatrice pour toutes les concentrations à l'étude.

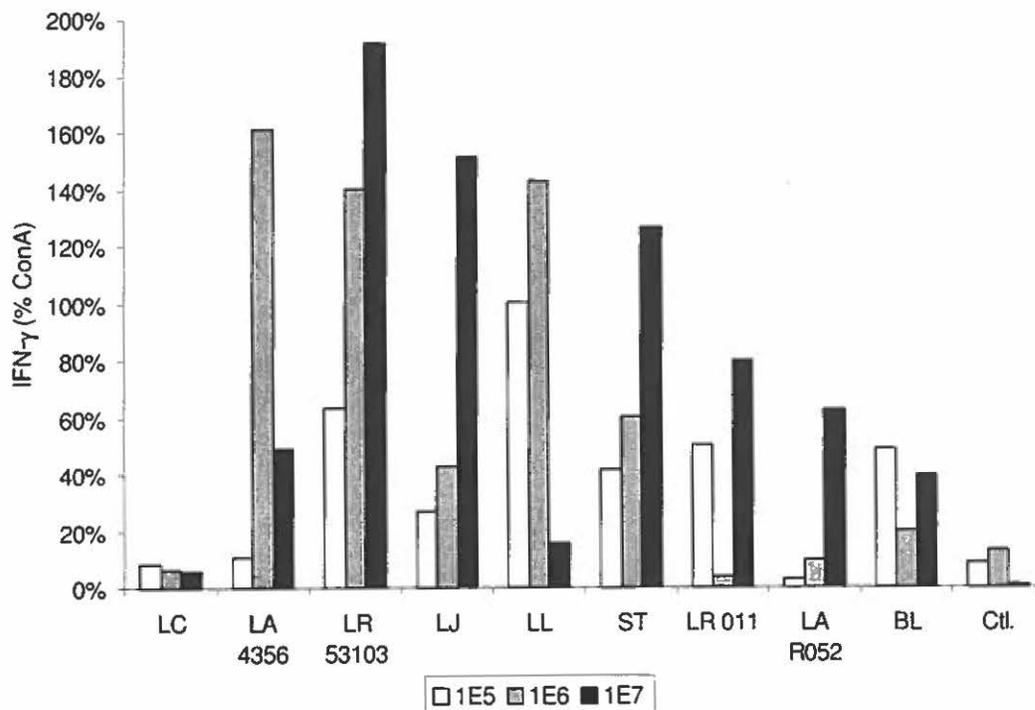
## 1.5 Expression du gène de l'IFN- $\gamma$

Le niveau de transcription du gène de l'interféron gamma fut mesuré sous diverses conditions par RT-PCR. Les ARN obtenus provenaient de cellules spléniques stimulées pendant 24 heures avec des bactéries lactiques. Les transcrits amplifiés furent révélés sur gel d'agarose (figure 14) et leur abondance relative fut calculée et mise sous forme graphique (figure 15).

Les données semi-quantitatives de RT-PCR nous montrent pour certaines bactéries une activité appréciable à  $10^5$  UFC/mL, qui s'intensifie à  $10^6$ . Les souches *L. johnsonii*, *L. rhamnosus* 53103 et *S. thermophilus* induisent l'expression du gène de façon concentration-dépendante, de  $10^5$  à  $10^7$  UFC/mL. Fait intéressant, les bactéries *L. acidophilus* ATCC 4356 et *L. lactis* sont fortement actives à  $10^6$  UFC/mL mais perdent de leur potentiel à plus haute concentration.



**Figure 14:** Exemple d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR représentant l'ARNm de l'IFN- $\gamma$ .  
Le gel fut préparé et analysé tel que décrit dans la figure 8. Les échantillons présentés sont ceux de la série  $10^6$  UFC/mL - 24 heures. La bande de 266 pb correspond à l'IFN- $\gamma$ .



**Figure 15:** Expression du gène de l'IFN- $\gamma$  par des splénocytes de souris C57BL/6 cultivés en présence de bactéries lactiques.  
100% (ConA  $10^5$ ) = 2,9; 100% ( $10^6$ ) = 3,0; 100% ( $10^7$ ) = 2,5. Voir fig. 9.

## 1.6 Sécrétion d'IFN- $\gamma$ bioactif

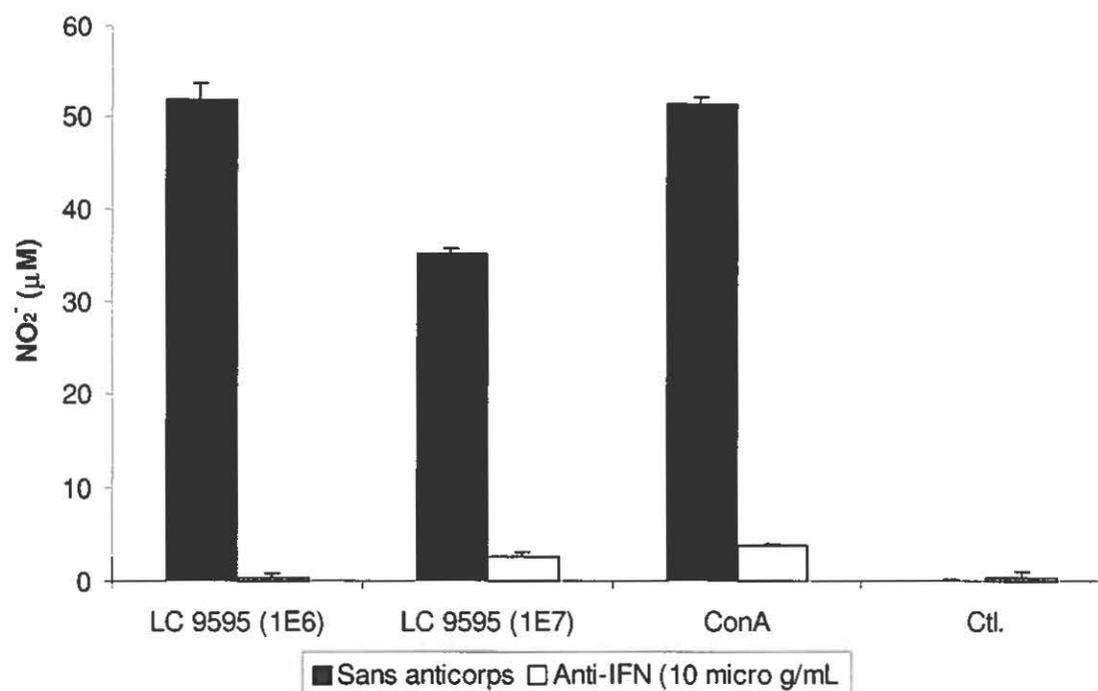
L'activité interféron gamma du surnageant fut mesurée à l'aide du test biologique mettant à profit la sensibilité des macrophages à l'IFN- $\gamma$  en présence de LPS. La production de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> par la lignée de macrophages murins RAW 264.7 est proportionnelle à la quantité d'IFN- $\gamma$  dans le milieu, lorsqu'une quantité sub-optimale de LPS est présente. Afin de vérifier cette relation, le test fut validé à deux reprises en ajoutant un anticorps monoclonal anti-IFN- $\gamma$  en même temps que les surnageants actifs. La figure 16 illustre les résultats de l'une de ces expériences contrôles. L'anticorps neutralisa complètement l'activité inductrice de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> des surnageants chez les cellules indicatrices (RAW) traitées.<sup>1</sup>

Les données recueillies par bioessai pour le protocole de criblage sont présentées dans la figure 17. Elles sont exprimées selon leur pourcentage d'activité par rapport au surnageant de cellules stimulées à la concanavaline A (contrôle positif pour l'IFN- $\gamma$ ). Le profil d'activation de l'IFN- $\gamma$  chez les bactéries lactiques démontre une importante démarcation entre les concentrations basses (10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> UFC/mL) et hautes (10<sup>7</sup> UFC/mL). Un sous-ensemble de bactéries incluant *L. rhamnosus* 53103, *L. johnsonii*, *L. lactis* et *S. thermophilus* est actif à de basses concentrations, alors que les autres bactéries semblent peu ou pas actives. Toutefois, à 10<sup>7</sup> UFC/mL, toutes les bactéries induisent la sécrétion d'IFN- $\gamma$  à des niveaux élevés (69% à 126% de la ConA). Ce dernier paramètre est donc peu utile pour comparer efficacement les bactéries, mais indique plutôt que toute bactérie lactique, à une concentration suffisamment élevée, pourra stimuler la production d'IFN- $\gamma$  par des splénocytes de souris.

Suivant le même protocole *in vitro*, des échantillons de surnageants de culture bactérienne furent également analysés. Une quantité de 1% (vol./vol.) de surnageant, préalablement filtré (porosité de 0,22  $\mu$ m), fut ajouté aux cultures de splénocytes et la production d'IFN- $\gamma$  fut mesurée par bioessai après 24 heures d'incubation. Les résultats d'une expérience sont représentés dans la figure 18. Remarquons d'emblée que l'échelle d'activité IFN- $\gamma$  du surnageant est réduite et que la valeur maximale de la série

---

1. Une concentration de 10 $\mu$ g/ $\mu$ L d'anticorps fut utilisée pour le test de neutralisation. Il fut toutefois possible d'obtenir dans des essais ultérieurs une neutralisation complète de l'activité à une concentration aussi basse que 16 ng/mL d'anticorps (données non montrées). Selon le manufacturier, 15 ng/mL de l'anticorps XMG1.2 peuvent neutraliser 50% de l'activité de 1 ng/mL d'IFN- $\gamma$  murin recombinant.

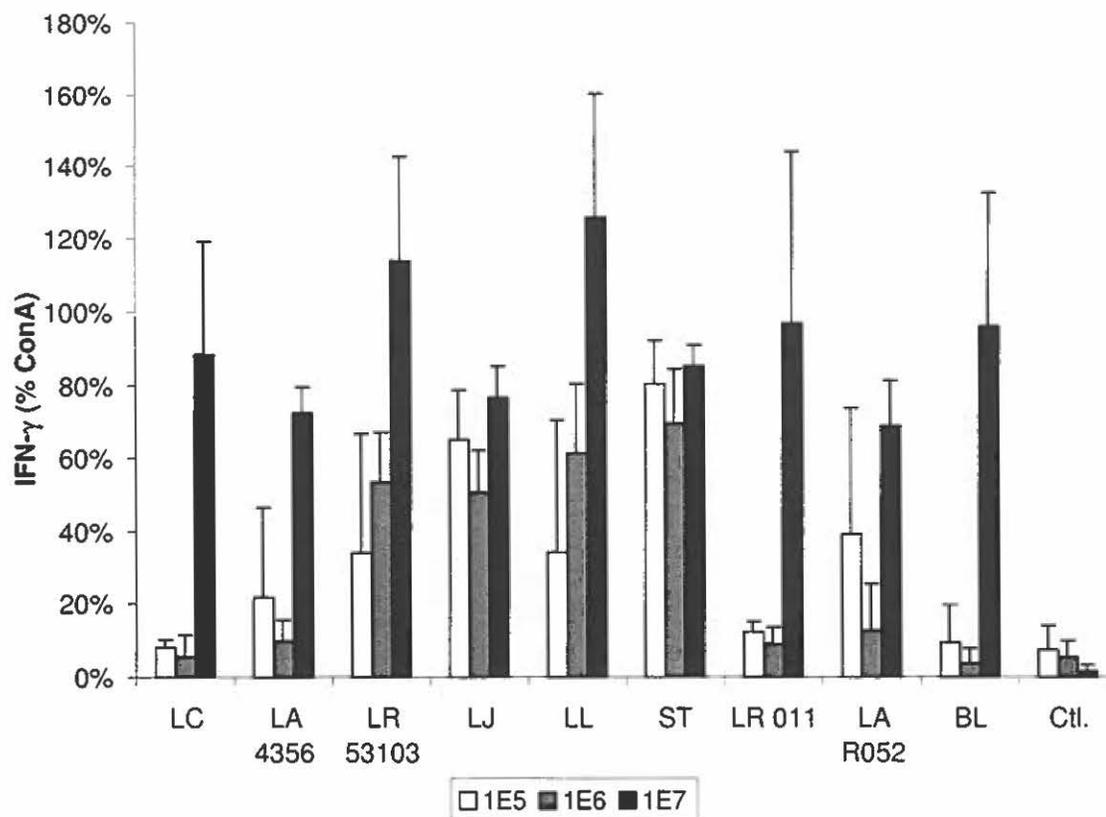


**Figure 16:** Validation du bioessai d'IFN- $\gamma$  en utilisant un anticorps neutralisant.

La spécificité du bioessai mesurant l'IFN- $\gamma$  bioactif a été vérifiée grâce à un anticorps monoclonal de rat anti-IFN- $\gamma$  de souris (10  $\mu$ g/mL). Des surnageants de cellules spléniques stimulées avec des bactéries lactiques (10<sup>6</sup> et 10<sup>7</sup> UFC/mL) ou de la ConA ont été testés avec (barres blanches) ou sans (barres noires) la présence d'anticorps.

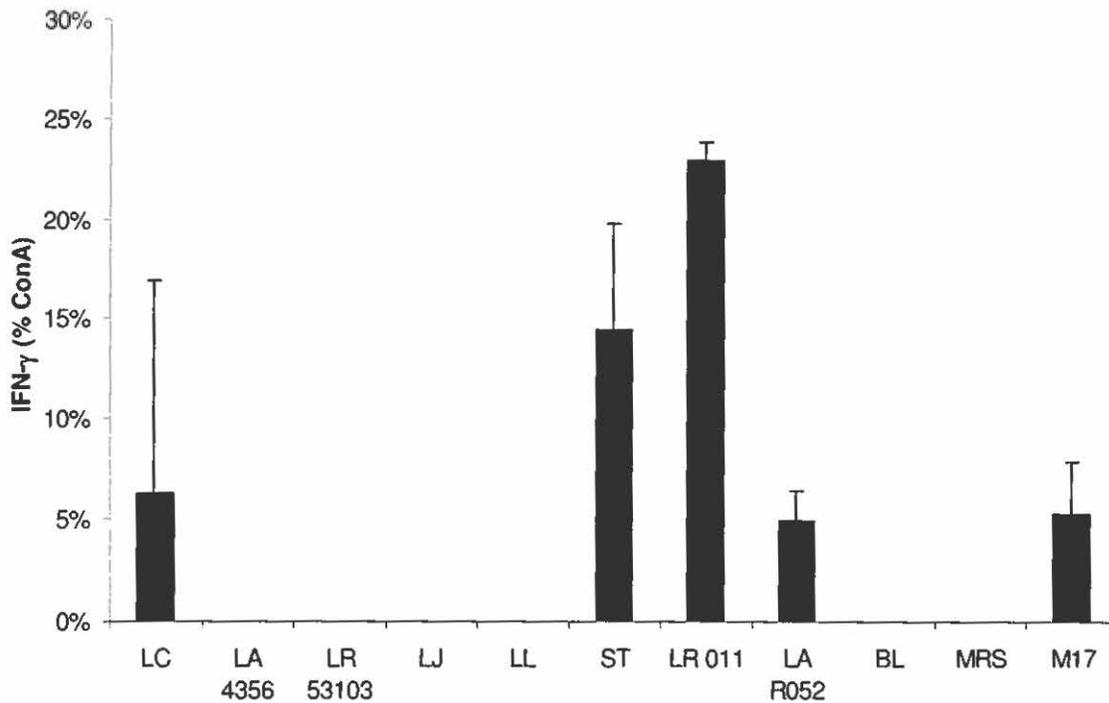
L'échelle représente la concentration de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en solution telle que mesurée par la réaction de Griess. Les barres verticales représentent les écarts-types calculés sur les dosages d'IFN- $\gamma$  réalisés en triplicata.

**LR 9595 :** *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595.



**Figure 17:** Sécrétion d'IFN- $\gamma$  bioactif par des splénocytes cultivés en présence de bactéries lactiques.

Les cellules spléniques furent cultivées tel que décrit dans la figure 9. Les surnageants étaient prélevés après 24 heures d'incubation et congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment du dosage d'IFN- $\gamma$ . Un bioessai, mesurant l'effet synergique du LPS et de l'IFN- $\gamma$  sur la production de  $\text{NO}_2^-$  par les cellules de la lignée RAW 264.7 a été exécuté pour chaque échantillon. Les quantités d'IFN- $\gamma$ , exprimées en  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2^-$ , ont été comparées à la production d'IFN- $\gamma$  en réponse à la ConA (contrôle positif, 100% dans l'échelle du graphique). 100% (1E5) =  $40,8 \mu\text{M NaNO}_2^-$ , 100% (1E6) =  $37,8 \mu\text{M NaNO}_2^-$ , 100% (1E7) =  $47,3 \mu\text{M NaNO}_2^-$ . Les résultats représentent la moyenne des valeurs de 3 expériences par série. Les barres verticales représentent les écarts-types calculés sur ces moyennes.



**Figure 18:** Sécrétion d'IFN- $\gamma$  bioactif par des splénocytes cultivés en présence de surnageants de cultures de bactéries lactiques.

Les cellules spléniques furent cultivées tel que décrit dans la figure 9, cette fois en présence de 1% vol./vol. de surnageants filtrés de cultures de bactéries lactiques.

La concentration d'IFN- $\gamma$  a été mesurée tel que détaillé dans la figure 17 et est exprimée en pourcentage du contrôle positif (ConA). 100% = 46,7  $\mu\text{M}$   $\text{NaNO}_2^-$ . Les contrôles négatifs consistaient en des milieux de culture stériles : **MRS** pour les lactobacilles et **M17** pour *S. thermophilus*. Les barres verticales représentent les écarts-types calculés sur les dosages d'IFN- $\gamma$  réalisés en triplicata. Les écarts-types des valeurs situées sous le seuil de détection ont été omises, pour plus de clarté.

d'échantillons n'atteint que 23% de l'activité de la ConA. Des milieux stériles de culture de lactobacilles (milieu MRS) et de streptocoques lactiques (milieu M17) ont été utilisés en tant que contrôles négatifs. Les fractions solubles de cultures *S. thermophilus* et *L. rhamnosus* R011 se démarquent des autres cultures par leur activité inductrice d'IFN- $\gamma$ . Sans être négligeables, les activités inductrices de ces surnageants bactériens sont quand même généralement très inférieures aux actions des bactéries entières décrites précédemment.

## 1.7 Expression du gène de l'IL-4

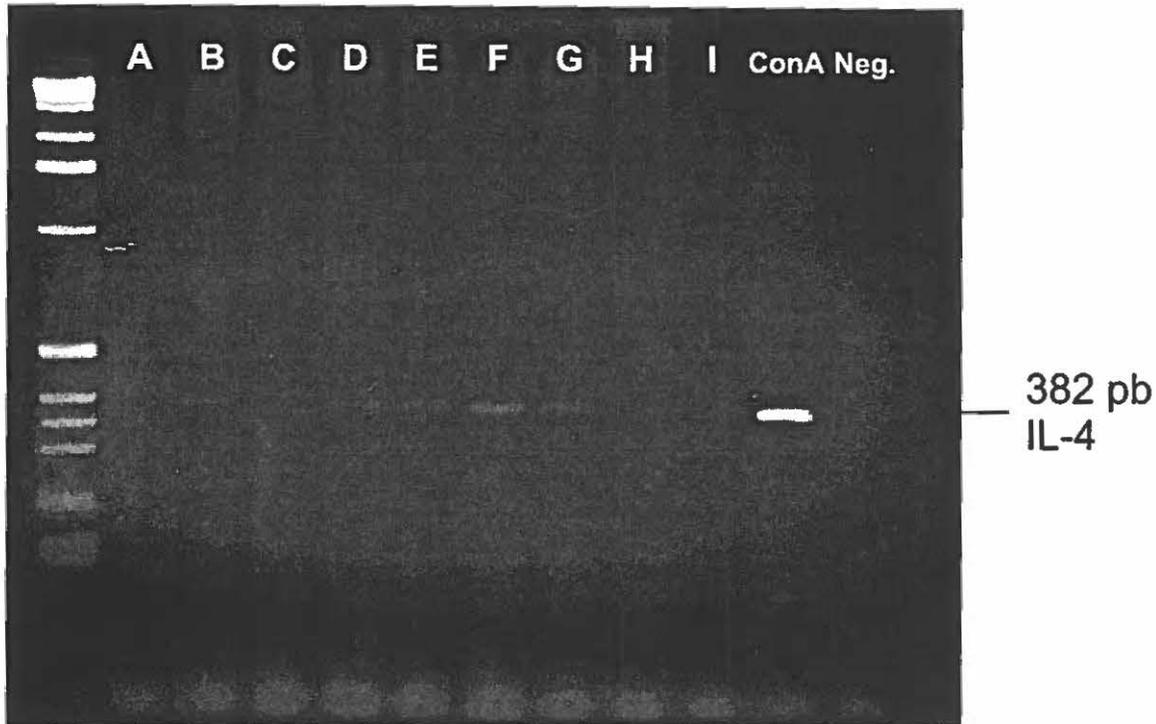
La dernière cytokine à être détectée et quantifiée par RT-PCR fut l'interleukine 4. La figure 19 représente un ensemble de bandes des transcrits de l'IL-4 amplifiés ayant migré sur gel d'agarose. Les résultats provenant des valeurs densitométriques relatives sont regroupés dans le graphique de la figure 20.

Les indices d'expression géniques sont généralement moindres que celles mesurées pour les autres cytokines. La valeur maximale atteint seulement 28% de l'expression induite par la ConA. Néanmoins, nous pouvons déceler un motif d'expression qui semble suivre celui des autres cytokines, avec les mêmes bactéries se distinguant par leur activité, tel *L. rhamnosus* 53101, *L. johnsonii*, *L. lactis* et *S. thermophilus*. L'espèce *L. rhamnosus* R011, une bactérie généralement peu active, est toutefois capable d'induire l'expression du gène de l'IL-4 à des niveaux avoisinant ceux attribués aux bactéries "stimulatrices".

## 2 Combinaisons de bactéries

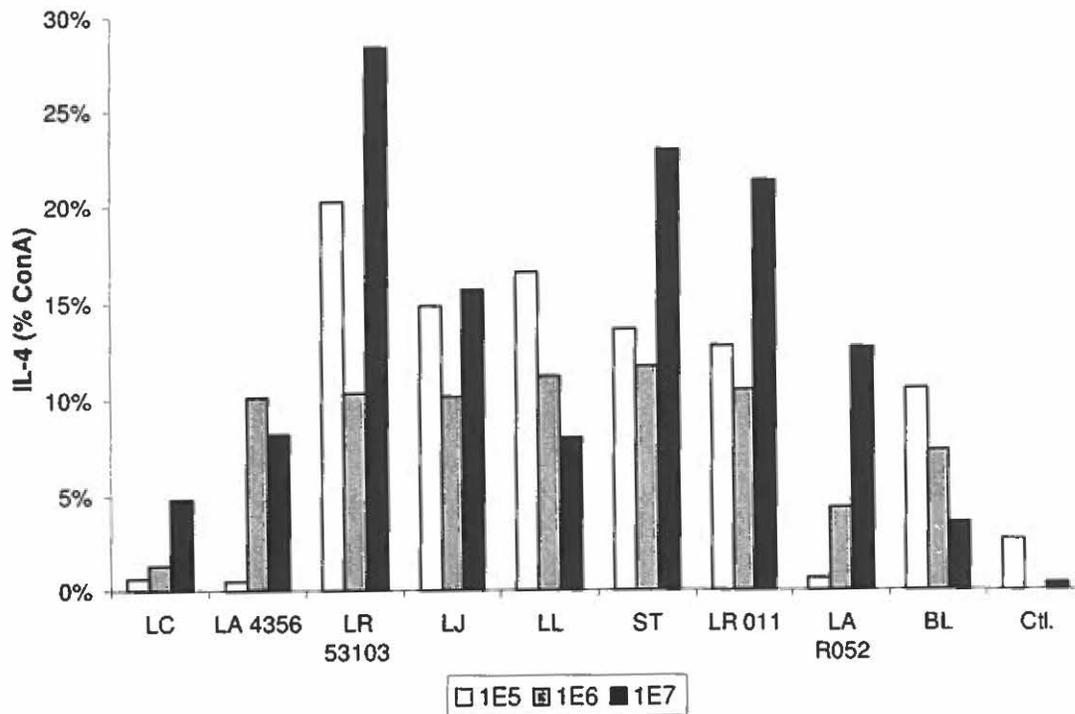
### 2.1 Sécrétion d'IFN- $\gamma$ bioactif

Différentes combinaisons de bactéries ont également été employées pour stimuler les splénocytes de souris *in vitro*. Les bactéries *L. johnsonii* et *S. thermophilus* furent combinées dans un mélange 50%-50% à des concentrations totales de  $10^5$ ,  $10^6$  et  $10^7$  UFC/mL. Les probiotiques *L. acidophilus* R052, *L. rhamnosus* R011 et *B. longum* R075 offertes par l'Institut Rosell-Lallemand furent également combinées deux par deux et



**Figure 19:** Exemple d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR représentant l'ARNm de l'IL-4.

Le gel fut préparé et analysé tel que décrit dans la figure 8. Les échantillons présentés sont ceux de la série  $10^6$  UFC/mL - 24 heures. La bande de 382 pb correspond à l'IL-4.



**Figure 20:** Expression du gène de l'IL-4 par des splénocytes de souris C57BL/6 cultivées en présence de bactéries lactiques.

100% (ConA  $10^5$ ) = 2,8; 100% ( $10^6$ ) = 4,0; 100% ( $10^7$ ) = 2,52. Voir fig. 9.

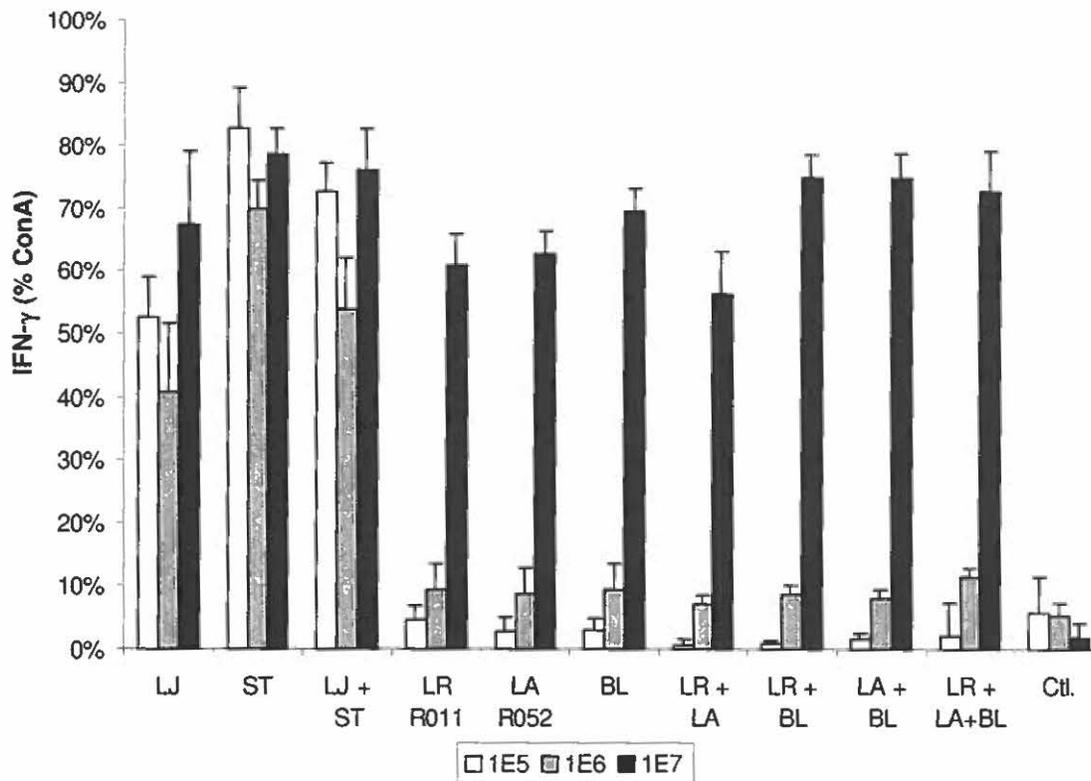
toutes les trois, pour atteindre les mêmes concentrations finales. Dans chaque cas, la production d'IFN- $\gamma$  bioactif fut mesurée dans le surnageant par bioessai.

Les résultats présentés dans la figure 21 ne démontrent aucune relation amplificatrice ou inhibitrice entre les bactéries. La combinaison de *L. johnsonii* et *S. thermophilus* à  $10^5$  et  $10^6$  UFC/mL induit une production d'IFN- $\gamma$  qui s'approche de la moyenne des espèces prises individuellement. Même constatation pour les trois bactéries Rosell-Lallemand qui sont toutes négatives à  $10^5$  et  $10^6$  UFC/mL, quelle que soit la combinaison. À  $10^7$  UFC/mL, toutes les bactéries sont fortement inductrices d'IFN- $\gamma$ , ce qui rendrait toute action synergique difficile sinon impossible à détecter.

### 3 Cytokines et souches de souris

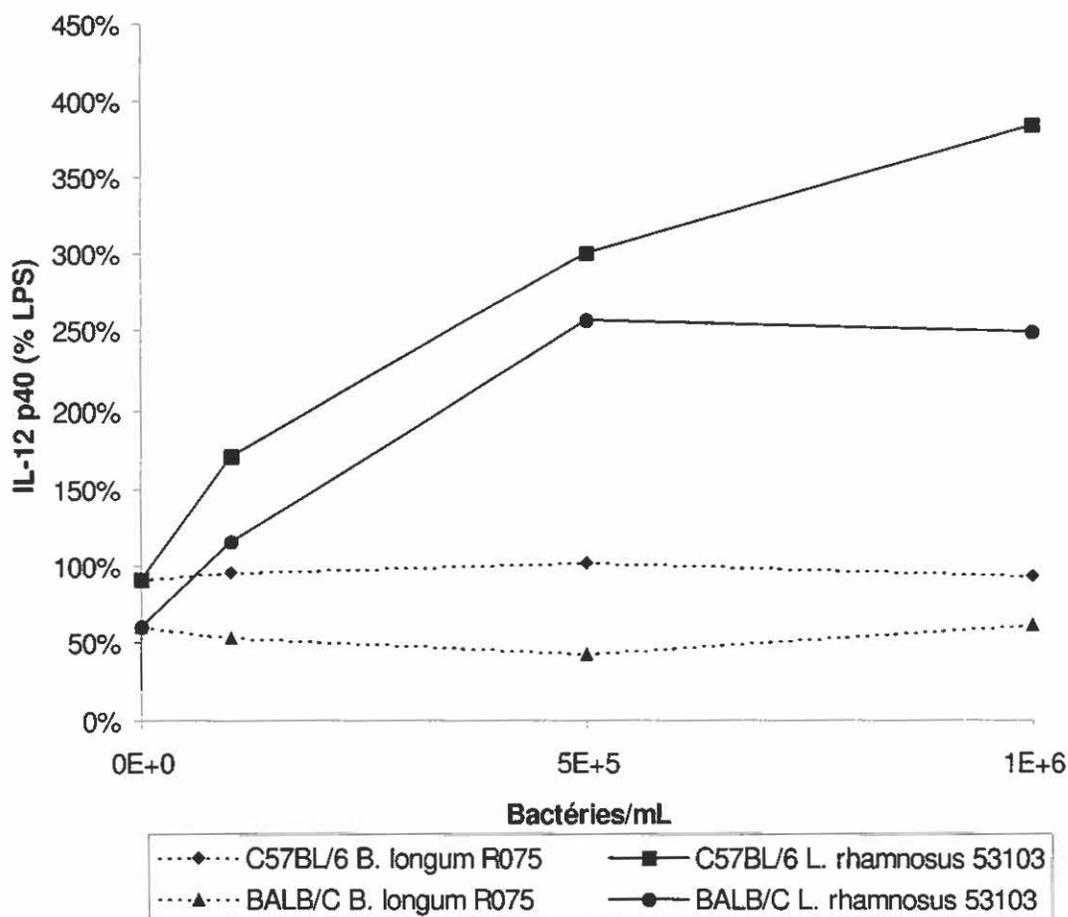
Dans le but d'observer des variations possibles de la sensibilité aux bactéries lactiques attribuables à la génétique de la souris, des expériences de stimulation *in vitro* additionnelles ont été effectuées en conservant un nombre restreint de paramètres (bactéries, concentrations, cytokines), mais cette fois en utilisant de façon parallèle des splénocytes de souches de souris C57BL/6 et BALB/c. Les bactéries *L. rhamnosus* ATCC 53103 et *B. longum* R075 furent inoculées à des concentrations de  $10^5$ ,  $5 \times 10^5$  et  $10^6$  bactéries/mL dans des cultures de cellules spléniques, et les quantités d'IFN- $\gamma$  et d'IL-12p40 furent déterminées dans le surnageant après 24 h.

Les figures 22 (IL-12) et 23 (IFN- $\gamma$ ) présentent les courbes de production de cytokines en fonction des concentrations de bactéries ajoutées, mesurées à partir des cultures de cellules spléniques (24 h) provenant des deux souches de souris. Les valeurs sont encore une fois exprimées en pourcentage des contrôles positifs: LPS pour l'IL-12p40 et ConA pour l'IFN- $\gamma$ . Nous voyons tout d'abord que l'expression basale d'IL-12p40 est inférieure chez les splénocytes de souris BALB/c comparativement aux C57BL/6. Ces dernières ont réagi plus fortement à *L. rhamnosus* 53103 et ont atteint un maximum de 384% à  $10^6$  UFC/mL. Les splénocytes de BALB/c ont plafonné aux environs de 250% à  $5 \times 10^5$  UFC/mL. La réactivité à *B. longum* est restée nulle chez les deux souches de souris, aux concentrations analysées.



**Figure 21:** Sécrétion d'IFN- $\gamma$  bioactif par des splénocytes cultivés en présence de bactéries lactiques en combinaisons.

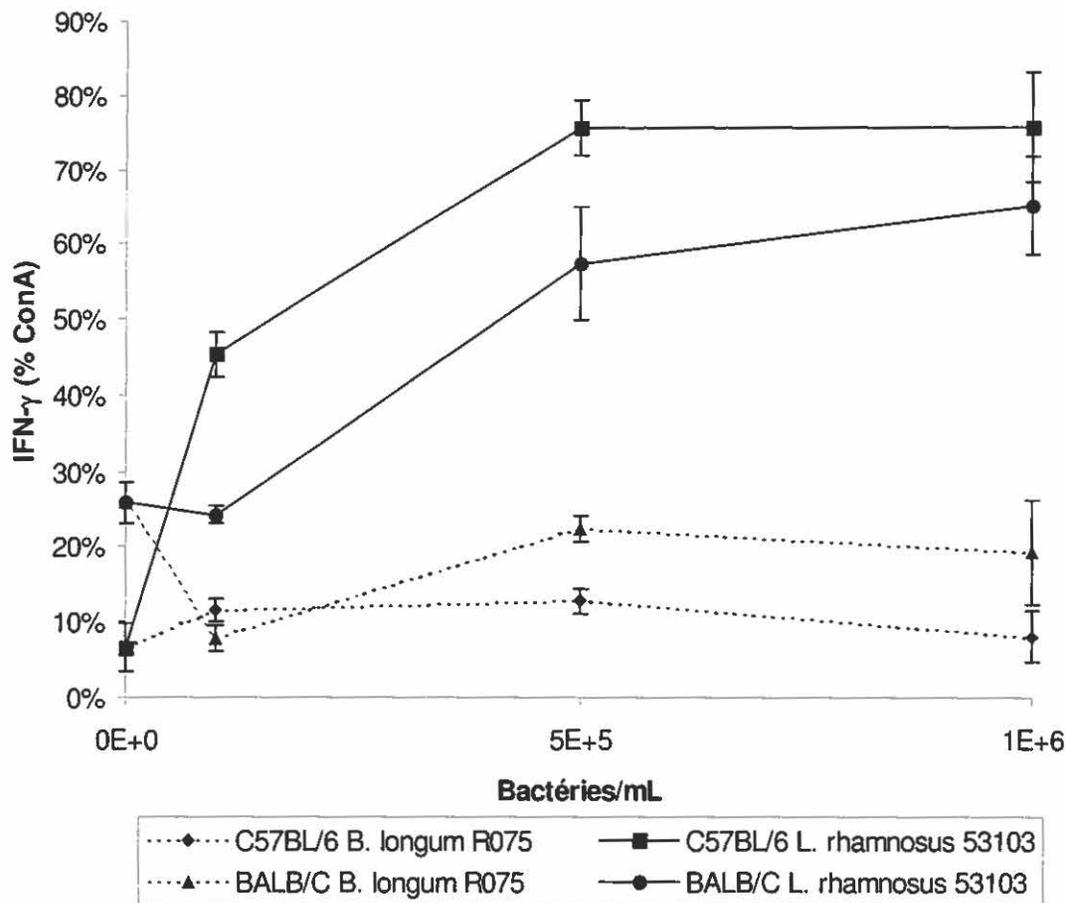
La concentration d'IFN- $\gamma$  a été mesurée tel que détaillé dans la figure 17 et est exprimé en pourcentage du contrôle positif (ConA). 100% (1E5) = 28,0  $\mu$ M NaNO<sub>2</sub>; 100% (1E6) = 27,1  $\mu$ M NaNO<sub>2</sub>; 100% (1E7) = 67,8  $\mu$ M NaNO<sub>2</sub>. Les concentrations de bactéries reflètent le nombre total de bactéries par mL. Un nombre égal de chaque espèce a été inclus dans les différentes combinaisons. Par exemple: LJ+ST (1E5) =  $5 \times 10^4$  LJ/mL +  $5 \times 10^4$  ST/mL. Les barres verticales représentent les écarts-types calculés sur les dosages d'IFN- $\gamma$  réalisés en triplicata.



**Figure 22:** Production d'IL-12 p40 par des splénocytes de souris en fonction de la dose de bactérie et de la souche de souris.

Les cellules spléniques de souris C57BL/6 et BALB/c furent cultivées en présence de différentes concentrations de *L. rhamnosus* ATCC 53103 (lignes pleines) et *B. longum* R075 (lignes pointillées), pour une durée d'incubation de 24 heures. La concentration d'IL-12 p40 présente dans le milieu a été mesurée par ELISA et convertie en pourcentage du contrôle positif (LPS 100 ng/mL, 100% dans l'échelle du graphique). 100% (C57BL/6) = 183,6 pg/mL; 100% (BALB/c) = 153,2 pg/mL. Des courbes reliant la production d'IL-12 p40 à la concentration de bactéries ont été tracées pour chaque série de données.

(◆) Cellules spléniques de souris C57BL/6 cultivées avec *B. longum* R075; (■) C57BL/6 + *L. rhamnosus* ATCC 53103; (▲) BALB/c + *B. longum*; (●) BALB/c + *L. rhamnosus*.



**Figure 23:** Production d'IFN- $\gamma$  par des splénocytes de souris en fonction de la dose de bactérie et de la souche de souris.

Voir la figure 22 pour les conditions de culture. La concentration d'IFN- $\gamma$  dans les surnageants fut mesurée par bioessai et convertie en pourcentage du contrôle positif (ConA, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100% dans l'échelle). 100% (C57BL/6) = 53,0  $\mu\text{M}$   $\text{NaNO}_2$ ; 100% (BALB/c) = 39,3  $\mu\text{M}$   $\text{NaNO}_2$ . Des courbes reliant la production d'IFN- $\gamma$  à la concentration de bactéries ont été tracées pour chaque série de données. Les barres verticales représentent les écarts-types calculés sur les dosages d'IFN- $\gamma$  réalisés en triplicata.

(◆) Cellules spléniques de souris C57BL/6 cultivées avec *B. longum* R075; (■) C57BL/6 + *L. rhamnosus* ATCC 53103; (▲) BALB/c + *B. longum*; (●) BALB/c + *L. rhamnosus*.

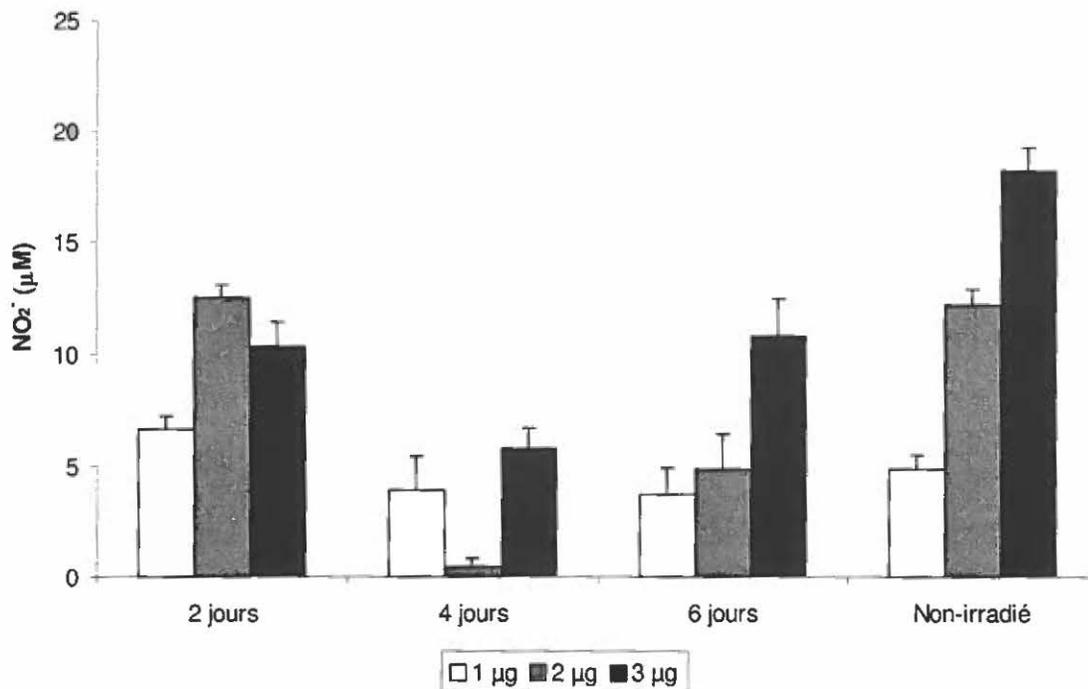
Dans le cas de l'IFN- $\gamma$ , sa production basale par les cellules de BALB/c fut cette fois supérieure à celle des cellules de C57BL/6. Les premières ne répondirent toutefois pas à une basse concentration ( $10^5$  UFC/mL) de *L. rhamnosus* 53103 et n'ont pu rejoindre les niveaux élevés d'IFN- $\gamma$  produits par les splénocytes de C57BL/6 à plus hautes concentrations de cette bactérie. Nous constatons également ici une absence de réponse à *B. longum*, pour les concentrations étudiées.

## **4 Expérience *in vivo* dans un modèle d'immunosuppression**

### **4.1 Essais préliminaires sur le dosage de la ConA et la cinétique**

Notre capacité à détecter une restauration de l'immunocompétence dans notre modèle reposait sur notre faculté à observer une différence dans la production d'IFN- $\gamma$  entre des splénocytes de souris saines et celle des splénocytes de souris irradiées. La dose de 500-550 rads ayant préalablement été choisie en raison de pouvoir immunodépresseur, il était impératif d'identifier la dose de ConA administrée aux cellules spléniques qui stimulerait préférentiellement les cellules compétentes. Il était également important de connaître le temps propice post-irradiation qui correspondrait à la phase de récupération de l'organisme et qui serait utilisée pour collecter les données. La figure 24 présente les résultats de l'expérience préliminaire exécutée pour répondre à ces questions.

Le groupe non-irradié de l'expérience représente la référence en terme de modulation de l'immunité. Nous voyons que 2 jours après irradiation, les splénocytes n'ont pas suffisamment perdu leur capacité à produire de l'IFN- $\gamma$ . Au temps 4 jours, l'immunodéficié est au contraire maximale, avec une production négligeable d'IFN- $\gamma$ . Après 6 jours, les splénocytes ont récupéré une partie de leur capacité à répondre à la ConA. Ce moment correspondrait donc à la phase de régénération. À ce temps, la dose de 3  $\mu$ g de ConA donne l'écart le plus marqué entre les souris irradiées et non-irradiées. C'est donc la dose prescrite pour réaliser la batterie de tests *ex vivo* subséquents.



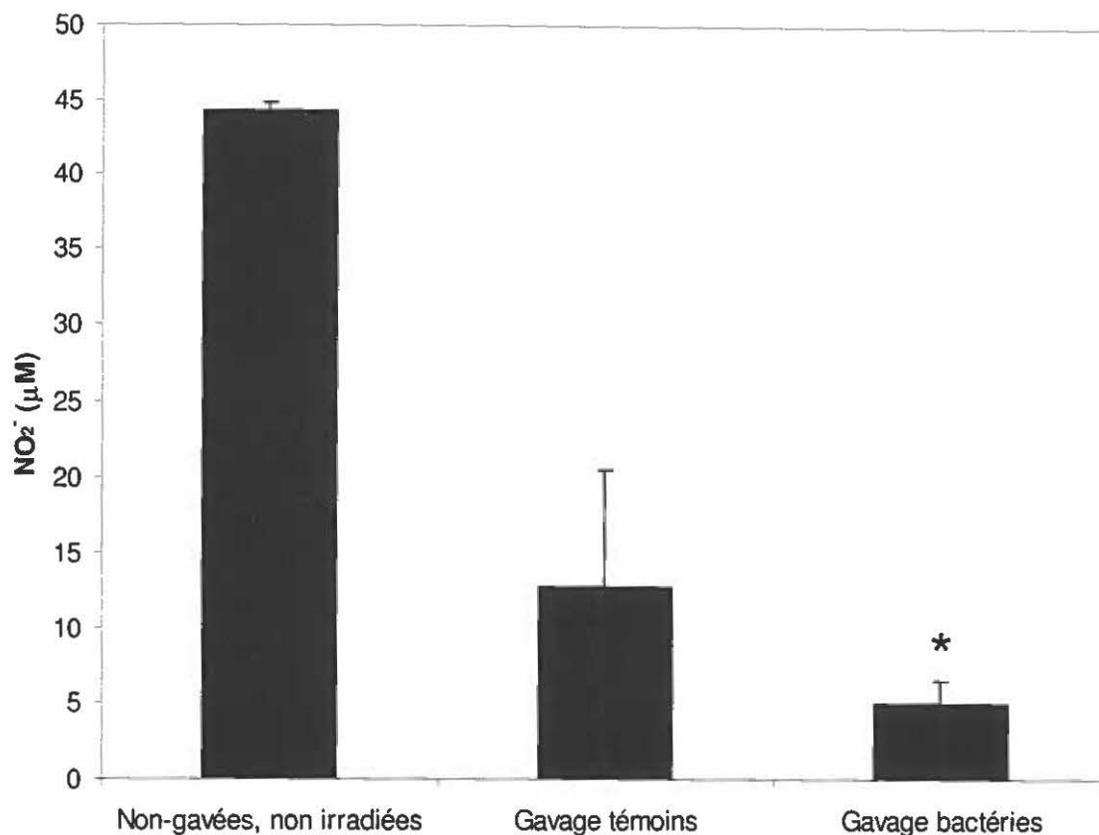
**Figure 24:** Production d'IFN- $\gamma$  bioactif par des splénocytes de souris irradiées en fonction du temps et de la dose de ConA

Des souris C57BL/6 ont été exposées à une dose de rayons X de 500 rads (2 souris par groupe). Elles ont ensuite été sacrifiées après 2, 4 et 6 jours. Un groupe témoin n'a pas été irradié. Les rates furent prélevées et les splénocytes ont été cultivés pendant 24 h en présence de ConA à des concentrations de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (barres blanches), 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (barres rayées) et 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (barres noires). La quantité d'IFN- $\gamma$  bioactif sécrété fut évaluée à la fin de cette période par bioessai. Les valeurs sont exprimées en  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2^-$  tel que révélé par la réaction de Griess. Les barres verticales représentent les écarts-types calculés sur les dosages d'IFN- $\gamma$  réalisés en triplicata.

## 4.2 Effet de bactéries administrées par gavage sur la production *ex vivo* d'IFN- $\gamma$ par des splénocytes de souris irradiées

À la fin des douze jours du protocole expérimental, la production d'IFN- $\gamma$  par les splénocytes des souris des trois groupes (non-traitées, gavage bactéries, gavage contrôle) a été mesurée par bioessai. La figure 25 illustre les résultats, placés dans trois colonnes représentant les moyennes des trois groupes, et exprimés en  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2^-$  tel qu'obtenu par la réaction de Griess dans le bioessai d'IFN- $\gamma$ . Les barres verticales représentent les écarts types à la moyenne.

La première colonne met en évidence la production d'IFN- $\gamma$  par des splénocytes de souris qui n'ont été ni gavées ni irradiées. Comme prévu, l'activité IFN- $\gamma$  des surnageants après stimulation des cellules par la ConA est importante et peu variable, ce qui confirme la validité du test et l'homogénéité des souris saines au niveau de l'immunité. La deuxième colonne représente la réponse des souris ayant été irradiées et gavées avec une solution sans bactéries. La conséquence du traitement était prévisible: une baisse sensible mais non totale de la capacité à produire de l'IFN- $\gamma$ . Notons que les réponses des souris de ce groupe étaient passablement hétérogènes. La troisième colonne représente la moyenne des valeurs obtenues du groupe de souris irradiées et gavées avec des bactéries lactiques. Contrairement à ce qui était attendu, la production d'IFN- $\gamma$  n'a pas augmenté par rapport au contrôle, mais afficha plutôt une tendance à la baisse évoquant une nette absence de récupération. Un test t de Student a souligné une différence modérément significative par rapport au contrôle traité, avec une valeur  $p$  de 0,034, donc en deçà du seuil de 0,05. Le faible écart-type dans ce groupe dénote une bonne homogénéité des réponses.



**Figure 25:** Production d'IFN- $\gamma$  bioactif par des splénocytes stimulés à la ConA de souris irradiées, selon le traitement administré.

Des souris C57BL/6 furent traitées pendant 6 jours, puis exposée à 550 rads de rayons X, et ensuite traitées pendant 6 autres jours avant d'être sacrifiées. Le groupe contrôle en santé (colonne 1, n=4) n'a été ni traité ni irradié. Le groupe témoin traité (colonne 2, n=6) a été irradié et gavé quotidiennement avec 1 mL d'une solution sucrée stérile. Le groupe au régime de bactéries lactiques (colonne 3, n=6) a été irradié et gavé quotidiennement avec 1 mL d'un mélange contenant  $10^9$  bactéries lactiques/mL.

Les splénocytes récoltés ( $2 \times 10^6$  par souris) furent stimulés en présence de 3  $\mu\text{g/mL}$  de ConA pendant 24 heures, après quoi la quantité d'IFN- $\gamma$  sécrété fut mesurée dans les surnageants par bioessai. Les valeurs sont exprimées en  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2^-$  tel que révélé par la réaction de Griess du bioessai spécifique à l'IFN- $\gamma$ . Les barres verticales représentent les écarts-types calculés sur les moyennes de chaque groupe expérimental. (\*)  $p \leq 0.05$  selon le test t de Student.

## CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Les multiples relations entre les micro-organismes et l'hôte sont le sujet d'études nombreuses et variées. Plusieurs d'entre elles suggèrent que la modulation du système immunitaire par les bactéries lactiques alimentaires passe par la sécrétion de cytokines. Les différents mécanismes menant à l'induction de ces réponses dépendent principalement de la nature de la bactérie et de la façon dont celle-ci est reconnue par les cellules du système immunitaire. Le but de ce travail consistait donc à comparer les niveaux de cytokines, exprimées au niveau génique ou sécrétées dans le milieu, par des cellules de rate de souris exposées *in vitro* à neuf souches ou espèces de bactéries lactiques, qu'il nous est possible de retrouver dans les aliments.

Il est important de réitérer que ce travail ne visait pas à révéler une quelconque stimulation de l'immunité par des bactéries lactiques, cela a déjà été démontré qualitativement à la fois *in vitro* et *in vivo* par de nombreuses équipes. Il s'agissait plutôt de comparer sur une base quantitative l'activité de plusieurs types de bactéries, dans un modèle *in vitro*. La conception du modèle ne visait surtout pas à reproduire les phénomènes qui ont lieu dans l'organisme. Par conséquent, les résultats ne prétendent pas traduire l'action réelle de ces micro-organismes sur le système immunitaire humain. Les différentes valeurs et indices d'expression de cytokines mesurés au cours de nos expériences pourraient à la limite être perçus comme des effets « potentiels » de ces bactéries, si elles se trouvaient dans l'organisme dans le même état, en présence des mêmes cellules, et aux mêmes concentrations, un scénario difficile à envisager.

Des équipes de chercheurs ont par le passé effectué des études comparatives *in vitro* (Miettinen *et al.*, 1996, 1998; Hesse *et al.*, 1999). Cependant, le nombre de facteurs qu'ils ont examiné est loin de rivaliser avec l'éventail de bactéries, de concentrations et de cytokines qui ont été agencées et mesurées dans le présent travail. Notre modèle *in vitro* utilisant des souris génétiquement identiques nous a permis de répéter des expériences sans craindre les variations qu'on retrouve couramment dans des modèles humains (typiquement l'usage de donneurs de sang périphérique pour la préparation de PBMC).

Ceci fut primordial dans l'établissement d'une approche quantitative ou semi-quantitative d'évaluation des propriétés immunomodulatrices des différentes bactéries à l'étude.

La plupart des espèces de bactéries étudiées dans le cadre de notre projet ont déjà figuré dans d'autres travaux publiés. Cependant, les souches et les provenances étaient rarement les mêmes. Notre hypothèse était que les capacités modulatrices d'une espèce de bactérie lactique donnée pouvait varier selon la souche. Cette hypothèse fut démontrée: des écarts importants dans l'induction de cytokines ont été observés entre les souches *L. rhamnosus* ATCC 53103 et *L. rhamnosus* R011, ainsi qu'entre *L. acidophilus* ATCC 4356 et *L. acidophilus* R052. Ceci établit une piste pour des travaux futurs recherchant les déterminants bactériens responsables de la modulation de l'immunité, qui pourraient être isolés par la comparaison de ces souches au niveau génétique et structural. La variation entre les souches pourrait aussi expliquer les différences entre les conclusions de nos travaux et de ceux d'autres équipes.

Dans nos études, nous avons mesuré l'expression du gène du TNF et la sécrétion de TNF bioactif par des cellules spléniques cultivées en présence d'une variété de bactéries lactiques. Le TNF est une cytokine produite par les macrophages tôt dans la réponse immunitaire (Sariban *et al.*, 1988) et qui coordonne les premières défenses de l'organisme. Cependant, une réaction trop intense conduisant à une production de TNF excessive peut être dommageable pour l'hôte (Tracey *et al.*, 1987). C'est donc une bonne nouvelle de constater que le TNF est induit par un ensemble de bactéries, mais seulement lorsque celles-ci sont présentes à des titres élevés. En contraste, l'IL-12 et d'IFN- $\gamma$  peuvent être induits à des titres bactériens réduits ( $10^5$ - $10^6$  UFC/mL); ces cytokines sont relativement inoffensives si produites localement et elles ont la faculté de renforcer les défenses adaptatives de l'organisme face à un agent infectieux. La constatation que ces deux cytokines peuvent être produites en réponse à des titres de bactéries n'induisant pas de réponse inflammatoire est prometteuse car elle confirme la basse nocivité des bactéries lactiques, une propriété fondamentale maintes fois soutenue par les résultats d'essais dans la population (Trapp *et al.*, 1993).

Nous avons remarqué que la production de TNF bioactif en réponse aux bactéries lactiques suivait d'assez près l'expression du gène, sauf dans le cas des bactéries *L. rhamnosus* R011 et *B. longum* R075 à  $10^7$  UFC/mL. Remarquons également que ces deux bactéries sont rarement de bonnes inductrices pour les autres cytokines étudiées. Ces différences ne sont pas irréconciliables si nous postulons que les cellules spléniques produiraient des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-4 ou TGF- $\beta$ ) en réponse à ces bactéries. Ces cytokines pourraient bloquer le processus de sécrétion du TNF à un endroit situé en aval de la transcription de son gène (Sariban *et al.*, 1988; Chantry *et al.*, 1989). L'induction de l'expression du gène de l'IL-4 détectée dans le cas de *L. rhamnosus* R011 pointe dans cette direction, car elle n'est pas accompagnée d'une induction de l'IFN- $\gamma$  ou de l'IL-12. Il serait clairement profitable de mesurer les niveaux de cytokines inhibitrices, au moins dans les échantillons de bactéries peu actives, pour discriminer les activités négatives des activités nettes nulles mais dynamiquement réprimées.

Il est difficile d'interpréter les résultats obtenus à partir de la mesure de l'expression du gène de l'IL-12 p40 par RT-PCR. La technique manquait de sensibilité (40 cycles étaient nécessaires pour visualiser des bandes) et de reproductibilité (peu d'échantillons furent amplifiés adéquatement, après des essais répétés). Les conditions de PCR ont été modifiées à plusieurs reprises, sans succès. Le temps et les ressources furent insuffisants pour tenter des essais avec d'autres paires d'amorces. Nous avons dès lors décidé de baser nos mesures d'IL-12 sur un test ELISA fiable et reproductible. Les valeurs tirées du RT-PCR comportant des échantillons  $10^6$  UFC/mL - 6h d'incubation sont tout de même porteuses d'informations utiles. Elles ne s'accordent toutefois pas avec deux phénomènes observés par ELISA. Une forte activité inductrice d'IL-12 p40 soluble est présente chez *L. rhamnosus* 53103, alors que le gène n'est pas ou peu exprimé. De plus, on note une production constitutive de la sous-unité p40, dont la concentration dans les contrôles négatifs s'approche de la valeur attribuable au LPS; nous n'avons pourtant détecté aucune activité transcriptionnelle basale s'approchant de celle induite par le LPS.

Il est bien connu que la chaîne p40 de l'IL-12 est hautement inductible au niveau transcriptionnel (Carra *et al.*, 2000) et qu'elle se retrouve en excès dans le milieu

extracellulaire par rapport à l'IL-12 p70. La plupart du temps, l'expression de l'IL-12 p40 est proportionnelle à la concentration et à l'activité de l'IL-12 dans des conditions physiologiques normales (Grazinelli *et al.*, 1993). Toutefois, les homodimères de p40 sont reconnus comme étant des antagonistes de l'activité IL-12, car ils se lient au récepteur sans déclencher de signal (Carra *et al.*, 2000). Néanmoins, dans nos expériences, l'activité biologique dépendante de l'IL-12, telle que mesurée par la production d'IFN- $\gamma$ , semble être proportionnelle à la concentration d'IL-12 p40 dans le milieu. Aucun échantillon affichant un niveau élevé d'IL-12 p40 ne semble avoir d'effet suppresseur sur la production d'IFN- $\gamma$  bioactif ou sur l'expression de son gène. Qui plus est, la mesure de l'IL-12 p40 à la fois par RT-PCR et par ELISA permet de faire un lien entre l'expression du gène et la sécrétion de son produit. Les hauts taux de l'unité p40 en solution facilitent également sa détection par ELISA et contribuent à diminuer les marges d'erreurs, un avantage non négligeable. Le choix de l'IL-12 p40 comme indicateur de la réponse IL-12 semble donc justifié.

La production d'IFN- $\gamma$  par les splénocytes démontre une corrélation marquante avec celle de l'IL-12 aux concentrations de bactéries inférieures à  $10^7$  UFC/mL. Les courbes de réponses de l'IL-12p40 et de l'IFN- $\gamma$  pour les souris C57BL/6 et BALB/c se superposent assez bien. Puisque les activités pro-IL-12 et pro-IFN- $\gamma$  des bactéries lactiques sont rapides (à l'intérieur de 24 heures), il serait raisonnable de penser qu'elles sont la conséquence de l'activation de l'immunité naturelle (innée) et seraient attribuables aux macrophages (IL-12) et aux cellules NK activées (IFN- $\gamma$ ). Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'effectuer des essais sur des souris *nude*, dépourvues de cellules T normales, et sur des souris *beige*, qui n'ont pas de cellules NK. Des expériences sur des populations cellulaires homogènes seraient également envisageables.

La situation semble être plus complexe lorsque les cultures de splénocytes sont exposées à  $10^7$  UFC/mL de bactéries. À cette concentration, trois constatations sont dignes de mention: i) La production d'IFN- $\gamma$  est très élevée pour toutes les bactéries testées. Elle est toutefois hautement variable entre les expériences, ce qui n'est pas observé à bas titres bactériens et témoignerait d'une certaine dérégulation de la réponse immunitaire. ii) Elle ne semble plus être liée à la concentration d'IL-12 p40. Des bactéries induisant une

réponse IL-12 modérée (*L. paracasei*, *L. rhamnosus* R011, *B. longum* R075) sont pourtant de fortes inductrices d'IFN- $\gamma$ . iii) La production d'IFN- $\gamma$  bioactif à  $10^7$  UFC/mL n'est pas liée au niveau de transcription de son gène, tel que mesuré par RT-PCR.

Un titre élevé de bactéries lactiques semble par conséquent déclencher des mécanismes distincts de ceux impliqués dans les réponses à des concentrations plus basses. Il serait concevable d'envisager qu'un ou plusieurs autres facteurs solubles entrent en jeu à cette concentration pour potentialiser ou supplémente l'action pro-IFN- $\gamma$  de l'IL-12. Un aspirant à ce rôle serait l'IL-18, qui agit sur les cellules NK et entre en synergie avec l'IL-12 pour activer la cellule et déclencher la production d'IFN- $\gamma$ . On a déjà démontré la production d'IL-18 en réponse à des bactéries lactiques (Miettinen *et al.*, 1998). L'IL-2, bien qu'étant un effecteur tardif de l'immunité, pourrait également être produit par les lymphocytes T "mémoire" et activer les NK. Un autre candidat serait l'IL-15 qui, comme l'IL-2, est un activateur de NK et serait produit par des monocytes activés (Lauwerys *et al.*, 2000). La plupart des autres facteurs produits lors de l'inflammation (prostaglandines, chimiokines, cytokines) pourraient aussi coopérer avec l'IL-12. Nous pouvons néanmoins éliminer le TNF, dont la production à des hautes doses de bactéries ne suit pas celle de l'IFN- $\gamma$ . Ces facteurs accessoires pourraient agir à plusieurs niveaux. Ils pourraient stabiliser les ARNm de l'IFN- $\gamma$ , ce qui expliquerait le découplage gène-activité décrit précédemment. Ils pourraient aussi modifier l'affinité du récepteur de l'IL-12 pour son ligand, ou modifier sa voie de signalisation (Chang *et al.*, 2000).

Un examen plus approfondi ferait remarquer que des hypothétiques résidus bactériens présents dans les surnageants de culture pourraient stimuler directement les cellules RAW 264.7, dans les bioessais, à produire du NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Cependant, rappelons-nous qu'un anticorps monoclonal neutralisant l'IFN- $\gamma$  a été en mesure d'annuler complètement l'activité de surnageants provenant de stimulations à  $10^7$  UFC/mL. L'activité IFN- $\gamma$  observée dans les surnageants est donc attribuable à l'IFN- $\gamma$  seul. En outre, selon Migliorini *et al.* (1991), la présence de LPS dans le bioessai et sa synergie avec l'IFN- $\gamma$  masque complètement toute autre action activant le macrophage qui serait attribuable à des facteurs solubles, comme le TNF ou le GM-CSF.

Un fait remarquable se dégage des résultats sur la stimulation de l'IFN- $\gamma$ : les bactéries non probiotiques (*L. lactis* et *S. thermophilus*) testées dans nos expériences semblent être généralement plus actives que les bactéries probiotiques étudiées. Nous devons toutefois être prudents avant de généraliser, vu le nombre restreint d'espèces non probiotiques dans notre protocole. On pourrait émettre comme hypothèse que les contacts continus entre l'hôte et les bactéries probiotiques, conditionnés par les impératifs de l'évolution, ont encouragé une diminution du pouvoir immunostimulant de ces organismes. Une activation chronique de l'immunité provoquée par des bactéries résidentes aurait des conséquences néfastes pour l'hôte. Les bactéries symbiotiques auraient avantage à éviter ces conséquences. Les bactéries lactiques qui ne persistent pas dans l'intestin n'auraient pas été soumises à cette pression évolutive et auraient par conséquent conservé leur plein potentiel immunostimulant. Ces suppositions, reprenant les postulats de l'évolution Darwinienne, pourraient être vérifiées en effectuant des comparaisons immunologiques et microbiologiques formelles de bactéries appartenant aux deux groupes.

Les macrophages et autres phagocytes peuvent répondre non seulement aux particules bactériennes entières, mais aussi à certains produits bactériens présents en solution. Par conséquent, nous avons étudié les propriétés modulatrices des surnageants de culture de bactéries. Ces surnageants furent filtrés à travers un filtre de 0,22  $\mu\text{m}$  pour éliminer les bactéries en suspension. Les cultures bactériennes liquides contenaient originellement entre  $10^8$  et  $10^9$  UFC/mL. Les surnageants ayant été administrés à 1% vol./vol. dans 1 mL, les puits de cultures de splénocytes contenaient donc l'équivalent de la production de  $10^6$ - $10^7$  bactéries actives. Les expériences mesurant la réponse en IFN- $\gamma$  bioactif à ces produits ont démontré que l'activité des fractions solubles ne corrélait aucunement avec l'activité des bactéries entières, et que les rares activités inductrices observées étaient généralement inférieures à celles obtenues avec des particules bactériennes irradiées. *L. rhamnosus* R011, et dans une moindre mesure *S. thermophilus*, semblent tout de même libérer des composés actifs. La nature de ces composés est inconnue. Il pourrait s'agir de débris de la paroi cellulaire riches en peptidoglycane ou en acides teichoïques, de lipoprotéines, d'ADN bactérien libre, de N-formyl-méthionyl-

leucyl-phénylalanine (fMLP), ou d'exopolysaccharides (EPS). Toutes ces macromolécules sont retrouvées chez les bactéries Gram positives et ont démontré une action immunostimulante dans des expériences *in vitro* (Lawrence et Nauciel, 1998; Cleveland *et al.*, 1996; Arbour *et al.*, 1996; Daley *et al.*, 1985; Krieg *et al.*, 1998; Brightbill *et al.*, 1999). Certaines souches de *S. thermophilus* et de lactobacilles peuvent produire des polysaccharides extracellulaires à des niveaux variables. La souche *L. rhamnosus* 9595M étudiée par notre équipe produit un type d'EPS qui entraîne une production d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$  chez des splénocytes de souris (résultats non publiés). Il est clair que des étapes additionnelles de purification et de normalisation seront nécessaires afin de caractériser en détail le ou les déterminants solubles qui sont actifs dans nos échantillons.

L'expression du gène de l'IL-4 est modulée à la hausse par un certain nombre de bactéries testées. Cependant, les niveaux détectés, tous inférieurs à 30% du contrôle positif, sont difficiles à interpréter, connaissant les limites de précision du RT-PCR semi-quantitatif pour les petites valeurs. En tenant compte des fluctuations, il est tout de même possible de dégager une tendance: l'activation du gène de l'IL-4 semble, à une échelle réduite, suivre celle du gène de l'IFN- $\gamma$ . Il est donc possible que les signaux inducteurs d'IFN- $\gamma$  puissent également activer l'IL-4 chez une sous-population de cellules immunes. Des cellules T ou NK-T pourraient être ainsi activées de façon non-spécifique. D'un autre côté, l'induction de l'IL-4 pourrait être la conséquence indirecte d'une activation généralisée des fonctions immunitaires. Son expression somme toute restreinte par rapport à l'IFN- $\gamma$  témoignerait d'une polarisation vers le profil Th1. Évidemment, pour soutenir ces hypothèses, une mesure plus directe de la production d'IL-4 dans notre modèle aurait été souhaitable. Il serait aussi intéressant de savoir comment les bactéries lactiques influencent l'expression et la sécrétion d'IL-4 après l'induction de cette cytokine par un mitogène ou un antigène.

Les micro-organismes ont des relations complexes avec le système immunitaire. Celui-ci a développé de nombreux moyens de reconnaître les organismes étrangers et de les détruire. Différentes voies existent pour activer les cellules immunitaires lorsqu'elles entrent en contact avec un microbe. Il est donc raisonnable de croire que des bactéries qui

empruntent des voies différentes pourraient exercer des actions complémentaires et donc agir en synergie pour activer le système immunitaire. Si cette hypothèse est véridique, nous devrions assister à une activité plus intense lorsque différents types de bactéries sont combinées dans une expérience de stimulation *in vitro*. C'est dans cette optique que nous avons effectué des essais sur des combinaisons de bactéries en mettant à profit notre modèle murin *in vitro* reproductible joint à notre bioessai d'IFN- $\gamma$  rapide et quantitatif. Malheureusement, aucune des cinq combinaisons de bactéries lactiques n'a révélé une quelconque association synergique pour la stimulation de l'IFN- $\gamma$ . Les splénocytes mis en présence de mélanges de bactéries ne produisaient que la moyenne des quantités d'IFN- $\gamma$  induits par les bactéries prises individuellement. L'activité des bactéries négatives demeurait inchangée lorsqu'elles étaient incluses dans un mélange. Par conséquent, les bactéries lactiques, de quelque nature qu'elles soient, exercent des actions purement additives et semblent donc emprunter une voie d'activation commune. Cette voie n'a pas encore été définie à ce jour.

Les producteurs de probiotiques et de bactéries lactiques thérapeutiques offrent le plus souvent leurs produits sous forme de mélanges d'espèces de bactéries. Même si aucun travail n'a pour l'instant identifié d'action synergique, il est tout à fait raisonnable d'affirmer que différentes bactéries peuvent avoir des effets complémentaires *in vivo*, que ce soit au niveau du système immunitaire ou ailleurs. Par exemple, un type de bactérie pourrait stimuler l'immunité cellulaire, un autre augmenterait la sécrétion d'anticorps, un troisième inhiberait la croissance de pathogènes intestinaux, et un dernier aiderait à la digestion du lactose. Les résultats de nos travaux n'entrent pas en contradiction avec ce principe, qui forme la base de la bactériothérapie combinée.

La nature et l'intensité de la réponse immunitaire dépend d'un nombre important de facteurs externes. On dénombre entre autres les hormones, le niveau de stress, l'exposition préalable à des pathogènes, la génétique, et comme semblent l'affirmer nos travaux et ceux de nos collègues, la composition de la microflore intestinale. Parmi ces paramètres, l'influence des variables génétiques sur la réponse aux bactéries lactiques n'a à notre connaissance jamais été explorée. Nous avons par conséquent reproduit nos expériences *in*

*in vitro* en utilisant des splénocytes de deux souches de souris: C57BL/6 et BALB/c. Nous cherchions à vérifier deux hypothèses: i) Certaines bactéries lactiques peuvent stimuler le système immunitaire, quel que soit le bagage génétique de l'hôte. ii) Les variations qualitatives et quantitatives observées sont imputables au profil T auxiliaire (Th1 ou Th2) préférentiellement activé. Comme il fut discuté dans le chapitre 1, l'immunité des souris C57BL/6 penche d'avantage vers un profil Th1, alors que les souris BALB/c sont orientées Th2 (Heinzel *et al.*, 1989).

Nos résultats confirment ces notions. Les splénocytes isolés à partir des deux souches de souris répondent à la bactérie *L. rhamnosus* ATCC 53103 par la production d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$ ; et sont insensibles à *B. longum* R075 pour toutes les concentrations étudiées. Leurs réponses varient néanmoins, et ce dans le même sens que l'orientation "Th" encouragée par leur empreinte génétique. Les splénocytes de souris BALB/c produisent moins d'IL-12 et moins d'IFN- $\gamma$  que les cellules de souris C57BL/6 en réponse à *L. rhamnosus*. Il fut malheureusement techniquement impossible de vérifier le niveau d'expression du gène de l'IL-4 pour chaque situation. Selon la littérature, l'orientation Th2 des souris BALB/c s'explique en partie par la modulation à la baisse de la chaîne  $\beta 2$  du récepteur de l'IL-12 (Himmelrich *et al.*, 1998), ce qui rend les effecteurs immunitaires moins sensibles à l'action de l'IL-12.

Ces constatations démontrent que la sensibilité aux bactéries lactiques dépend de certains facteurs génétiques. Il serait intéressant de faire des liens entre la sensibilité aux bactéries lactiques chez des individus d'une part, et leur susceptibilité à développer certains désordres intestinaux (ou même systémiques) d'autre part. On pense évidemment aux allergies, aux inflammations chroniques, à des infections, à des tumeurs, etc. Un nouveau champ de recherche pourrait s'ouvrir, où l'on chercherait à adapter certains types de bactérie au patient selon le malaise à prévenir ou à traiter.

Un des buts de l'exercice de criblage *in vitro* était de sélectionner des bactéries selon leur potentiel immunostimulateur afin de les inclure dans des expériences *in vivo* subséquentes. Le choix du modèle animal a posé problème. Il est généralement accepté que la modulation de l'immunité par des bactéries lactiques *in vivo* chez un organisme sain

est un phénomène transitoire et auto-limitant (Shroff *et al.*, 1995). C'est donc dans une situation de désordre que nous serions à même d'observer une action attribuable à des bactéries ayant été administrées oralement et ayant colonisé temporairement le tractus intestinal. Dans ce contexte, les bactéries pourraient bien renforcer la réponse immunitaire et améliorer sa régulation, mais elles seraient surtout susceptibles de promouvoir le maintien ou le rétablissement de l'équilibre des paramètres immunitaires. Une des façons d'induire un désordre immunologique est l'irradiation. C'est une approche qui affecte toutes les facettes du système immunitaire et qui peut être réversible. C'est aussi un bon modèle pour reproduire les désordres causés par la radiothérapie et par l'exposition aux radiations liée à un accident industriel ou domestique. Des modèles de chimiothérapie (Kaneko *et al.*, 1999) et de radiothérapie (Miyanomae et Frindel, 1988) furent utilisés avec succès dans des études d'immunomodulation par des produits naturels issus de la médecine chinoise. Nous avons par conséquent choisi d'exposer des souris gavées avec des bactéries lactiques à une dose de rayons X immunodépressive pour ensuite étudier leur capacité à répondre à un stimulus par la production d'IFN- $\gamma$ .

Nous avons administré un mélange de quantités égales de *L. lactis* R187, *S. thermophilus* R083 et *L. acidophilus* R052. Les deux premières bactéries se sont avérées les plus efficaces pour stimuler la production de cytokines, à travers les concentrations étudiées. La troisième est un probiotique stimulant modérément la production de cytokines *in vitro* et étant reconnu pour sa faculté à survivre dans l'intestin et à adhérer à l'épithélium (Coconnier *et al.*, 1993). L'accès à de grandes quantités de cellules viables, sous forme d'une poudre lyophilisée commerciale, a également joué dans le choix de ces bactéries.

Après six jours de récupération post-irradiation, les splénocytes de souris irradiées et gavées avec le mélange de bactéries ont été stimulés avec une dose sub-optimale de ConA, avec l'intention d'induire la production d'IFN- $\gamma$ . Ces cellules ont produit significativement moins ( $p = 0,034$ ) d'IFN- $\gamma$  bioactif que les cellules de souris irradiées gavées avec une solution sans bactérie. Ces dernières affichaient une production atténuée mais mesurable d'IFN- $\gamma$ , signe d'un début de récupération. Les bactéries n'ont donc pas

aidé la restauration de l'immunocompétence chez les souris irradiées, et ont même semblé freiner ce processus.

À la lumière de ces résultats, plusieurs interprétations peuvent être émises afin d'expliquer cette apparente anomalie.

1. L'absence de récupération peut s'expliquer simplement par une activité nulle des bactéries administrées. Cependant, cela n'expliquerait pas l'inhibition observée.
2. Les bactéries lactiques peuvent inhiber la réponse des splénocytes aux mitogènes. L'équipe de Kijavainen (1999) a utilisé un modèle *in vivo* semblable au nôtre (mais sans irradiation) et a mesuré la réponse proliférative à la ConA des splénocytes de souris gavées avec des bactéries. Certaines bactéries ont augmenté leur prolifération, mais la majorité l'ont diminuée. La prolifération de splénocytes, et la production d'IFN- $\gamma$  induits par la ConA, pourraient aller de pair.
3. Les radiations ionisantes, incluant les rayons X, affectent principalement les cellules activées et en division. Elles peuvent augmenter l'apoptose ou induire l'anergie (absence de réponse) chez ces cellules (Pamphilon *et al.* 1991). Si nous supposons que les cellules spléniques ont été activées par les bactéries alimentaires après 6 jours de traitement, l'action cytotoxique des rayons X aurait pu provoquer l'effet inverse de celui attendu et supprimer davantage le système immunitaire.
4. Les bactéries pourraient exercer une action directement inhibitrice, en déclenchant la production de facteurs suppresseurs tels l'IL-4, l'IL-10 et le TGF- $\beta$ . Ces cytokines peuvent être produites dans la muqueuse intestinale et joueraient un rôle dans la tolérance orale (Gonnella *et al.*, 1998).
5. Le régime et les dosages n'étaient peut être pas optimaux. Ces paramètres furent issus de travaux antérieurs et d'expériences préliminaires. Il est néanmoins possible que des ajustements sur la dose de bactéries et sur le temps alloué à la récupération permettraient de révéler un effet autre que celui observé ici.

Il est clair qu'un raffinement du modèle nous permettrait d'éliminer ses faiblesses et de mettre ses avantages de l'avant. Un premier pas serait d'utiliser un traitement immunosuppresseur non cytotoxique. Une bonne approche serait celle de l'immunosuppression aux corticostéroïdes, qui serait moins dévastatrice pour l'organisme, davantage réversible, et qui refléterait les perturbations immunitaires courantes causées par le stress.

## CONCLUSION

Grâce à des expériences nombreuses et riches d'informations révélatrices, le voile est en voie d'être levé sur l'effet qu'ont les bactéries lactiques sur l'immunité. Il est maintenant accepté que ces bactéries influencent le système immunitaire par une multitude de façons, et que ces actions sont en grande majorité bénéfiques pour l'hôte. Les objectifs de ce travail étaient en premier lieu de caractériser la modulation de la sécrétion de cytokines par un large éventail de bactéries lactiques et d'en effectuer une étude comparative sur une base semi-quantitative; en second lieu d'utiliser les informations récoltées pour concevoir un modèle animal *in vivo* dans l'espoir de détecter une régénération de la réponse immunitaire imputable aux bactéries sélectionnées et administrées.

Nous avons constaté que certaines espèces de bactéries lactiques peuvent stimuler l'expression des gènes du TNF, de l'IL-12 p40 et de l'IFN- $\gamma$ , ainsi que leur production dans le milieu extracellulaire. Cette stimulation est fortement dépendante de la souche étudiée, de la dose administrée et de la souche de souris utilisée comme source de cellules indicatrices. Par contre, l'activation de la production de cytokines n'est pas influencée outre mesure par une synergie d'espèces ou de souches utilisées en combinaison. Une seule voie d'activation semble donc être commune à toutes les bactéries lactiques.

La production d'IFN- $\gamma$  suit la même progression que celle de l'IL-12, selon la dose et le type de bactérie. Les deux cytokines sont donc dynamiquement liées. L'activation de cette facette de l'immunité, probablement attribuable à l'activité des macrophage et des cellules NK, correspond à la polarisation des cytokines vers un profil Th1. Les résultats de notre étude montrent que ce profil était plus fortement encouragé chez les souris C57BL/6 comparativement aux souris BALB/c, en accord avec la littérature. Le profil Th1 favoriserait l'immunité anti-microbienne, anti-tumorale, et anti-allergique.

Les bactéries *S. thermophilus* R083, *L. delbruckeii* ssp. *lactis* R187, *L. rhamnosus* ATCC 53103, *L. johnsonii* C4, et *L. acidophilus* R052 se sont avérées les plus efficaces, en ordre décroissant, pour leur capacité à stimuler la production de cytokines. Ce classement

informel tient principalement compte de la capacité qu'avaient ces bactéries d'agir fortement aux trois concentrations données, de façon reproductible. Notons que les deux premières positions sont occupées par des bactéries lactiques non probiotiques.

Nous avons également constaté deux tendances somme toute incertaines: la faible activation du gène de l'IL-4 et l'activité pro-IFN- $\gamma$  de certains surnageants de culture bactérienne. Ces activités ont été observées chez une sélection restreinte de bactéries. Les deux phénomènes demandent un examen plus poussé.

Finalement, un modèle animal mesurant la récupération de la capacité des splénocytes à produire de l'IFN- $\gamma$  *ex vivo* a été conçu. Une sélection des bactéries étudiées a été administrée oralement afin de connaître leur impact sur l'homéostasie immunitaire. Les expériences *in vivo* ont montré qu'un régime quotidien de bactéries lactiques ne contribue pas à la récupération de la capacité à produire de l'IFN- $\gamma$  chez des souris irradiées. Une baisse modérément significative de la production d'IFN- $\gamma$  a même été observée chez les souris ayant subi un traitement oral constitué d'un mélange de bactéries.

Les résultats de ces travaux invitent d'autres chercheurs à se pencher sur les déterminants moléculaires qui expliqueraient les différences observées, du côté des bactéries et de l'hôte. Ces résultats s'ajoutent à la masse d'informations sur les propriétés immunomodulatrices *in vitro* et *in vivo* des bactéries lactiques utilisées dans l'industrie.

## REMERCIEMENTS

Ce travail est le fruit du dévouement et de la collaboration de plusieurs personnes. L'approche multidisciplinaire qui fut empruntée dès le départ réclamait l'intervention d'un nombre appréciable de spécialistes, qui par leurs expertises et leurs connaissances ont permis la réalisation du projet, efficacement et sans heurts.

Mes premières éloges vont à mon directeur de recherche, le docteur Daniel Oth, qui m'a pris sous son aile et m'a guidé dans mon cheminement. Ses généreux conseils, son enthousiasme inébranlable et ses décisions équitables m'ont permis de mener le projet à terme dans la bonne humeur.

Ma co-directrice, le docteur Monique Lacroix fut également d'une aide inestimable. Sa rigueur, sa renommée et son flair ont permis de recruter des collaborateurs et de les convaincre de l'utilité de notre projet. Merci de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire. Merci aussi au docteur Blaise Ouattarra pour sa disponibilité et ses conseils judicieux en bactériologie. Je désire également exprimer ma gratitude envers le docteur Denis Roy, du CRDA, qui en plus de nous fournir des sujets d'étude fut aussi d'un grand secours lorsque vint le temps de prendre des décisions importantes.

À Denise Cloutier, la maman du labo, mille fois merci. Si le laboratoire du Dr. Oth est reconnu comme étant l'un des plus agréables, c'est sans nul doute grâce à Denise et à Cindy et Sylvie, mes soeurs spirituelles, avec qui j'ai échangé librement et eu beaucoup de plaisir. Un merci spécial à Manon qui m'a épaulé au cours de la rédaction de ce mémoire. Je t'aime.

J'exprime ma reconnaissance à Lallemand-Rosell pour nous avoir fourni du matériel d'étude de qualité et pour nous avoir conseillé judicieusement. Je m'adresse plus spécialement au Dr. Jacques Goulet, au Dr. Thomas Tompkins et à Mme Lyne Villeneuve.

Je remercie le FCAR et l'INRS-Institut-Armand-Frappier pour leur support financier par l'octroi de bourses d'excellence. Ce projet fut réalisé dans le cadre d'une subvention du CORPAQ.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AGGARWAL, B. B. et K. Natarajan. 1996. «Tumor necrosis factors: developments during the last decade». Eur Cytokine Netw, vol. 7, no. 2, p. 93-124.
- AHRTLEY, D. L. et G. Denariáz. 1993. «The role of lactic acid bacteria in yogurt fermentation.». Int. J. Immunotherapy, vol. 9, no. 1, p. 3-18.
- ANDUS, T., T. Geiger, T. Hirano, T. Kishimoto et P. C. Heinrich. 1988. «Action of recombinant human interleukin 6, interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha on the mRNA induction of acute-phase proteins». Eur J Immunol, vol. 18, no. 5, p. 739-746.
- ARBOUR, N., P. Tremblay et D. Oth. 1996. «N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces and modulates IL-1 and IL-6 in human PBMC». Cytokine, vol. 8, no. 6, p. 468-475.
- ASO, Y., H. Akaza, T. Kotake, T. Tsukamoto, K. Imai et S. Naito. 1995. «Preventive effect of a Lactobacillus casei preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial. The BLP Study Group». Eur Urol, vol. 27, no. 2, p. 104-109.
- BECKER, S. et E. G. Daniel. 1990. «Antagonistic and additive effects of IL-4 and interferon-gamma on human monocytes and macrophages: effects on Fc receptors, HLA-D antigens, and superoxide production». Cell Immunol, vol. 129, no. 2, p. 351-362.
- BERGSTEDT-LINDQVIST, S., H. B. Moon, U. Persson, G. Moller, C. Heusser et E. Severinson. 1988. «Interleukin 4 instructs uncommitted B lymphocytes to switch to IgG1 and IgE». Eur J Immunol, vol. 18, no. 7, p. 1073-1077.
- BLANCHARD, D. K., J. Y. Djeu, T. W. Klein, H. Friedman et W. E. d. Stewart. 1986. «Interferon-gamma induction by lipopolysaccharide: dependence on interleukin 2 and macrophages». J Immunol, vol. 136, no. 3, p. 963-970.
- BRIGHTBILL, H. D., D. H. Libraty, S. R. Krutzik, R. B. Yang, J. T. Belisle, J. R. Bleharski, M. Maitland, M. V. Norgard, S. E. Plevy, S. T. Smale, P. J. Brennan, B. R. Bloom, P. J. Godowski et R. L. Modlin. 1999. «Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors». Science, vol. 285, no. 5428, p. 732-736.
- CARRA, G., F. Gerosa et G. Trinchieri. 2000. «Biosynthesis and posttranslational regulation of human IL-12». J Immunol, vol. 164, no. 9, p. 4752-4761.
- CARSWELL, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore et B. Williamson. 1975. «An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 72, no. 9, p. 3666-3670.

CAUX, C., C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt et J. Banchereau. 1992. «GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells». Nature, vol. 360, no. 6401, p. 258-261.

CELLA, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia et G. Alber. 1996. «Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation». J Exp Med, vol. 184, no. 2, p. 747-752.

CHAMPISI, J. H., L. E. Bermudez et L. S. Young. 1994. «The role of cytokines in mycobacterial infection». Biotherapy, vol. 7, no. 3-4, p. 187-193.

CHANG, J. T., B. M. Segal, K. Nakanishi, H. Okamura et E. M. Shevach. 2000. «The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigen-specific IFN-gamma production by resting T cells is IL-12 dependent and is mediated by up-regulation of the IL-12 receptor beta2 subunit». Eur J Immunol, vol. 30, no. 4, p. 1113-1119.

CHANTRY, D., M. Turner, E. Abney et M. Feldmann. 1989. «Modulation of cytokine production by transforming growth factor-beta». J Immunol, vol. 142, no. 12, p. 4295-4300.

CHATURVEDI, P., Q. Yu, S. Southwood, A. Sette et B. Singh. 1996. «Peptide analogs with different affinities for MHC alter the cytokine profile of T helper cells». Int Immunol, vol. 8, no. 5, p. 745-755.

CHEHIMI, J. et G. Trinchieri. 1994. «Interleukin-12: a bridge between innate resistance and adaptive immunity with a role in infection and acquired immunodeficiency». J Clin Immunol, vol. 14, no. 3, p. 149-161.

Chen, Y. H., N. M. Chiu, M. Mandal, N. Wang et C. R. Wang. 1997. «Impaired NK1+ T cell development and early IL-4 production in CD1- deficient mice». Immunity, vol. 6, no. 4, p. 459-467.

CHOMARAT, P. et J. Banchereau. 1997. «An update on interleukin-4 and its receptor». Eur Cytokine Netw, vol. 8, no. 4, p. 333-344.

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». Infect Immun, vol. 64, no. 6, p. 1906-1912.

COCONNIER, M. H., M. F. Bernet, S. Kerneis, G. Chauviere, J. Fourniat et A. L. Servin. 1993. «Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion». FEMS Microbiol Lett, vol. 110, no. 3, p. 299-305.

COLLE, J. H., P. B. Falanga, 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, no. 2, p. 175-184.

COUTURIER, C., N. Haeffner-Cavaillon, M. Caroff et M. D. Kazatchkine. 1991. «Binding sites for endotoxins (lipopolysaccharides) on human monocytes». J Immunol, vol. 147, no. 6, p. 1899-1904.

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, no. 9, p. 1553-1558.

DALEY, L., G. B. Pier, J. D. Liporace et D. D. Eardley. 1985. «Polyclonal B cell stimulation and interleukin 1 induction by the mucoid exopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* associated with cystic fibrosis». J Immunol, vol. 134, no. 5, p. 3089-3093.

D'ANDREA, A., M. Rengaraju, N. M. Valiante, J. Chehimi, M. Kubin, M. Aste, S. H. Chan, M. Kobayashi, D. Young, E. Nickbarg et et al. 1992. «Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells». J Exp Med, vol. 176, no. 5, p. 1387-1398.

DE SIMONE, C., B. Bianchi Salvadori, E. Jirillo, L. Baldinelli, F. Bitonti et R. Vesely 1989. «Yoghurt and the immune response». Dans C. De Simone, B. Bianchi Salvadori, E. Jirillo, L. Baldinelli, F. Bitonti et R. Vesely, (éd.). Fermented Milks, Current Research. Londres: John Libbey Eurotext, p. 63-67.

DONNET-HUGHES, A., F. Rochat, P. Serrant, J. M. Aeschlimann et E. J. Schiffrin. 1999. «Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose». J Dairy Sci, vol. 82, no. 5, p. 863-869.

DUNNE, C., L. Murphy, S. Flynn, L. O'Mahony, S. O'Halloran, M. Feeney, D. Morrissey, G. Thornton, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, E. M. Quigley, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan et J. K. Collins. 1999. «Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials». Antonie Van Leeuwenhoek, vol. 76, no. 1-4, p. 279-292.

FERRICK, D. A., M. D. Schrenzel, T. Mulvania, B. Hsieh, W. G. Ferlin et H. Lepper. 1995. «Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo». Nature, vol. 373, no. 6511, p. 255-257.

FISCH, H. et G. E. Gifford. 1983. «A photometric and plaque assay for macrophage mediated tumor cell cytotoxicity». J Immunol Methods, vol. 57, no. 1-3, p. 311-325.

FULLER, R. 1989. «Probiotics in man and animals». J Appl Bacteriol, vol. 66, no. 5, p. 365-378.

GACZYNSKA, M., K. L. Rock et A. L. Goldberg. 1993. «Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes [see comments] [published erratum appears in Nature 1995 Mar 16;374(6519):290]». Nature, vol. 365, no. 6443, p. 264-267.

GATELY, M. K., A. G. Wolitzky, P. M. Quinn et R. Chizzonite. 1992. «Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12». Cell Immunol, vol. 143, no. 1, p. 127-142.

Gazzinelli, R. T., S. Hieny, T. A. Wynn, S. Wolf et A. Sher. 1993. «Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts [see comments]». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 90, no. 13, p. 6115-6119.

GENDRON, R. L., F. P. Nestel, W. S. Lapp et M. G. Baines. 1991. «Expression of tumor necrosis factor alpha in the developing nervous system». Int J Neurosci, vol. 60, no. 1-2, p. 129-136.

GILL, H. S., K. J. Rutherford, J. Prasad et P. K. Gopal. 2000. «Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019)». Br J Nutr, vol. 83, no. 2, p. 167-176.

GONNELLA, P. A., Y. Chen, J. Inobe, Y. Komagata, M. Quartulli et H. L. Weiner. 1998. «In situ immune response in gut-associated lymphoid tissue (GALT) following oral antigen in TCR-transgenic mice». J Immunol, vol. 160, no. 10, p. 4708-4718.

HA, C. L., J. H. Lee, H. R. Zhou, Z. Ustunol et J. J. Pestka. 1999. «Effects of yogurt ingestion on mucosal and systemic cytokine gene expression in the mouse». J Food Prot, vol. 62, no. 2, p. 181-188.

HATCHER, G. E. et R. S. Lambrecht. 1993. «Augmentation of macrophage phagocytic activity by cell-free extracts of selected lactic acid-producing bacteria». J Dairy Sci, vol. 76, no. 9, p. 2485-2492.

HEINZEL, F. P., M. D. Sadick, B. J. Holaday, R. L. Coffman et R. M. Locksley. 1989. «Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets». J Exp Med, vol. 169, no. 1, p. 59-72.

HERIAS, M. V., C. Hesse, E. Telemo, T. Midtvedt, L. A. Hanson et A. E. Wold. 1999. «Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* colonizing the intestine of gnotobiotic rats». Clin Exp Immunol, vol. 116, no. 2, p. 283-290.

HESSLE, C., L. A. Hanson et A. E. Wold. 1999. «Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production». Clin Exp Immunol, vol. 116, no. 2, p. 276-282.

HIMMELRICH, H., C. Parra-Lopez, F. Tacchini-Cottier, J. A. Louis et P. Launois. 1998. «The IL-4 rapidly produced in BALB/c mice after infection with *Leishmania major* down-regulates IL-12 receptor beta 2-chain expression on CD4+ T cells resulting in a state of unresponsiveness to IL-12». J Immunol, vol. 161, no. 11, p. 6156-6163.

JANEWAY, C. et P. Travers 1996. «Host defense against infection». Dans C. Janeway et P. Travers, (éd.). Immunobiology : the immune system in health and disease. San Francisco: Current Biology, p. 1 v. (various pagings).

KANEKO, M., T. Kawakita, Y. Kumazawa, H. Takimoto, K. Nomoto et T. Yoshikawa. 1999. «Accelerated recovery from cyclophosphamide-induced leukopenia in mice administered a Japanese ethical herbal drug, Hochu-ekki-to». Immunopharmacology, vol. 44, no. 3, p. 223-231.

KASAHARA, T., J. J. Hooks, S. F. Dougherty et J. J. Oppenheim. 1983. «Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets». J Immunol, vol. 130, no. 4, p. 1784-1789.

KATO, I., K. Endo et T. Yokokura. 1994. «Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice». Int J Immunopharmacol, vol. 16, no. 1, p. 29-36.

KATO, I., K. Tanaka et T. Yokokura. 1999. «Lactic acid bacterium potently induces the production of interleukin-12 and interferon-gamma by mouse splenocytes». Int J Immunopharmacol, vol. 21, no. 2, p. 121-131.

KATO, I., T. Yokokura et M. Mutai. 1983. «Macrophage activation by *Lactobacillus casei* in mice». Microbiol Immunol, vol. 27, no. 7, p. 611-618.

KATO, I., T. Yokokura et M. Mutai. 1984. «Augmentation of mouse natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* and its surface antigens». Microbiol Immunol, vol. 28, no. 2, p. 209-217.

Kirjavainen, P. V., H. S. El-Nezami, S. J. Salminen, J. T. Ahokas et P. F. Wright. 1999. «The effect of orally administered viable probiotic and dairy lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation». FEMS Immunol Med Microbiol, vol. 26, no. 2, p. 131-135.

KITAZAWA, H., K. Matsumura, T. Itoh et T. Yamaguchi. 1992. «Interferon induction in murine peritoneal macrophage by stimulation with *Lactobacillus acidophilus*». Microbiol Immunol, vol. 36, no. 3, p. 311-315.

KOHNO, T., M. T. Brewer, S. L. Baker, P. E. Schwartz, M. W. King, K. K. Hale, C. H. Squires, R. C. Thompson et J. L. Vannice. 1990. «A second tumor necrosis factor receptor gene product can shed a naturally occurring tumor necrosis factor inhibitor». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 87, no. 21, p. 8331-8335.

KRIEG, A. M., L. Love-Homan, A. K. Yi et J. T. Harty. 1998. «CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge». J Immunol, vol. 161, no. 5, p. 2428-2434.

KUBIN, M., M. Kamoun et G. Trinchieri. 1994. «Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells». J Exp Med, vol. 180, no. 1, p. 211-222.

- LAUWERYS, B. R., N. Garot, J. C. Renauld et F. A. Houssiau. 2000. «Cytokine production and killer activity of NK/T-NK cells derived with IL-2, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18». J Immunol, vol. 165, no. 4, p. 1847-1853.
- LAWRENCE, C. et C. Nauciel. 1998. «Production of interleukin-12 by murine macrophages in response to bacterial peptidoglycan». Infect Immun, vol. 66, no. 10, p. 4947-4949.
- LEE, J. H. 1998. «Immunostimulative effect of commercial Bifidobacteria used in yogurt culture starters». Food Science and Biotechnology, vol. 7, no. 1, p. 46-50.
- LUNDGREN, M., U. Persson, P. Larsson, C. Magnusson, C. I. Smith, L. Hammarstrom et E. Severinson. 1989. «Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells». Eur J Immunol, vol. 19, no. 7, p. 1311-1315.
- MADARA, J. L. 1997. «The chameleon within: improving antigen delivery». Science, vol. 277, no. 5328, p. 910-911.
- MADSEN, K. L., J. S. Doyle, L. D. Jewell, M. M. Tavernini et R. N. Fedorak. 1999. «Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice». Gastroenterology, vol. 116, no. 5, p. 1107-1114.
- MAJAMAA, H. et E. Isolauri. 1997. «Probiotics: a novel approach in the management of food allergy». J Allergy Clin Immunol, vol. 99, no. 2, p. 179-185.
- MAJAMAA, H., E. Isolauri, M. Saxelin et T. Vesikari. 1995. «Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis». J Pediatr Gastroenterol Nutr, vol. 20, no. 3, p. 333-338.
- MANGAN, D. F., G. R. Welch et S. M. Wahl. 1991. «Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and IL-1 beta prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes». J Immunol, vol. 146, no. 5, p. 1541-1546.
- 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, no. 7, p. 859-864.
- METCHNIKOFF, E. et P. C. Michell. 1908. The prolongation of life; optimistic studies. New York, G.P. Putnam.
- 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». Infect Immun, vol. 66, no. 12, p. 6058-6062.

- MIETTINEN, M., J. Vuopio-Varkila et K. Varkila. 1996. «Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria». Infect Immun, vol. 64, no. 12, p. 5403-5405.
- MIGLIORINI, P., G. Corradin et S. B. Corradin. 1991. «Macrophage NO<sub>2</sub>- production as a sensitive and rapid assay for the quantitation of murine IFN-gamma». J Immunol Methods, vol. 139, no. 1, p. 107-114.
- MIYANOMAE, T. et E. Frindel. 1988. «Radioprotection of hemopoiesis conferred by *Acanthopanax senticosus* Harms (Shigoka) administered before or after irradiation». Exp Hematol, vol. 16, no. 9, p. 801-806.
- MORATA De Ambrosini, V., S. Gonzalez, G. Perdigon, A. P. De Ruiz Holgado et O. G. 1998. «Immunostimulating activity of cell walls from lactic acid bacteria and related species». Food and agricultural immunology, vol. 10, no. 2, p. 183-191.
- MORTENSEN, R. F., J. Shapiro, B. F. Lin, S. Douches et R. Neta. 1988. «Interaction of recombinant IL-1 and recombinant tumor necrosis factor in the induction of mouse acute phase proteins». J Immunol, vol. 140, no. 7, p. 2260-2266.
- 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, no. 1, p. 57-64.
- NEDWIN, G. E., L. P. Svedersky, T. S. Bringman, M. A. Palladino, Jr. et D. V. Goeddel. 1985. «Effect of interleukin 2, interferon-gamma, and mitogens on the production of tumor necrosis factors alpha and beta». J Immunol, vol. 135, no. 4, p. 2492-2497.
- OHASHI, T., Y. Minamishima, T. Yokokura et M. Mutai. 1989. «Induction of resistance in mice against murine cytomegalovirus by cellular components of *Lactobacillus casei*». Biotherapy, vol. 1, no. 2, p. 89-95.
- OLSSON, I., T. Gatanaga, U. Gullberg, M. Lantz et G. A. Granger. 1993. «Tumour necrosis factor (TNF) binding proteins (soluble TNF receptor forms) with possible roles in inflammation and malignancy». Eur Cytokine Netw, vol. 4, no. 3, p. 169-180.
- OUWEHAND, A. C., V. K. Pirkka, C. Shortt et S. J. Salminen. 1999. «Probiotics: mechanisms and established effects». International Dairy Journal, vol. 9, no. p. 43-52.
- PAMPILION, D. H., A. A. Alnaqdy et T. B. Wallington. 1991. «Immunomodulation by ultraviolet light: clinical studies and biological effects [published erratum appears in Immunol Today 1991 Jul;12(7):227]». Immunol Today, vol. 12, no. 4, p. 119-123.
- PARKER, D. C. 1993. «T cell-dependent B cell activation». Annu Rev Immunol, vol. 11, no. p. 331-360.

PAUL, W. E. 1991. «Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine». Blood, vol. 77, no. 9, p. 1859-1870.

PERDIGON, G., M. E. de Macias, S. Alvarez, G. Oliver et A. A. de Ruiz Holgado. 1986. «Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice». Infect Immun, vol. 53, no. 2, p. 404-410.

PERDIGON, G., M. E. de Macias, S. Alvarez, G. Oliver et A. P. de Ruiz Holgado. 1988. «Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*». Immunology, vol. 63, no. 1, p. 17-23.

PERDIGON, G., M. E. Nader de Macias, S. Alvarez, G. Oliver et A. A. Pesce de Ruiz Holgado. 1987. «Enhancement of immune response in mice fed with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*». J Dairy Sci, vol. 70, no. 5, p. 919-926.

PERDIGON, G., M. E. Nader de Macias, S. Alvarez, G. Oliver et A. A. Pesce de Ruiz Holgado. 1990. «Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk fermented with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*». J Dairy Res, vol. 57, no. 2, p. 255-264.

Phillips, W. A., M. Croatto et J. A. Hamilton. 1990. «Priming the macrophage respiratory burst with IL-4: enhancement with TNF-alpha but inhibition by IFN-gamma». Immunology, vol. 70, no. 4, p. 498-503.

POPOVA, P., G. Guencheva, G. Davidkova, A. Bogdanov, E. Pacelli, G. Opalchenova, T. Kutzarova et C. Koychev. 1993. «Stimulating effect of DEODAN (an oral preparation from *Lactobacillus bulgaricus* "LB51") on monocytes/macrophages and host resistance to experimental infections». Int J Immunopharmacol, vol. 15, no. 1, p. 25-37.

PRESKY, D. H., U. Gubler, R. A. Chizzonite et M. K. Gately. 1995. «IL12 receptors and receptor antagonists». Res Immunol, vol. 146, no. 7-8, p. 439-445.

ROMAGNANI, S., E. Maggi, P. Parronchi, D. Macchia, M. P. Piccinni et M. Ricci. 1991. «Increased numbers of Th2-like CD4+ T cells in target organs and in the allergen-specific repertoire of allergic patients. Possible role of IL-4 produced by non-T cells». Int Arch Allergy Appl Immunol, vol. 94, no. 1-4, p. 133-136.

SALOFF-COSTE, C. J. «Lactic Acid Bacteria». Danone World Newsletter, no. 5. [http://www.danonenewsletter.fr/eng/news\\_5/sum.html](http://www.danonenewsletter.fr/eng/news_5/sum.html).

SARIBAN, E., K. Imamura, R. Luebbers et D. Kufe. 1988. «Transcriptional and posttranscriptional regulation of tumor necrosis factor gene expression in human monocytes». J Clin Invest, vol. 81, no. 5, p. 1506-1510.

SCHIFFRIN, E. J., F. Rochat, H. Link-Amster, J. M. Aeschlimann et A. Donnet-Hughes. 1995. «Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria». J Dairy Sci, vol. 78, no. 3, p. 491-497.

SECKINGER, P., J. H. Zhang, B. Hauptmann et J. M. Dayer. 1990. «Characterization of a tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) inhibitor: evidence of immunological cross-reactivity with the TNF receptor». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 87, no. 13, p. 5188-5192.

SHIBATA, Y., W. J. Metzger et Q. N. Myrvik. 1997. «Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan: mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production». J Immunol, vol. 159, no. 5, p. 2462-2467.

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, no. 4, p. 278-287.

SHIMAMOTO, Y., R. L. Chen, A. Bollon, A. Chang et A. Khan. 1988. «Monoclonal antibodies against human recombinant tumor necrosis factor: prevention of endotoxic shock». Immunol Lett, vol. 17, no. 4, p. 311-317.

SHROFF, K. E., K. Meslin et J. J. Cebra. 1995. «Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut». Infect Immun, vol. 63, no. 10, p. 3904-3913.

SOLIS-PEREYRA, B., N. Aattouri et D. Lemonnier. 1997. «Role of food in the stimulation of cytokine production». Am J Clin Nutr, vol. 66, no. 2, p. 521S-525S.

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, no. 12, p. 899-907.

STANDIFORD, T. J., R. M. Strieter, S. W. Chensue, J. Westwick, K. Kasahara et S. L. Kunkel. 1990. «IL-4 inhibits the expression of IL-8 from stimulated human monocytes». J Immunol, vol. 145, no. 5, p. 1435-1439.

STEFFEN, M., M. Abboud, G. K. Potter, Y. P. Yung et M. A. Moore. 1989. «Presence of tumour necrosis factor or a related factor in human basophil/mast cells». Immunology, vol. 66, no. 3, p. 445-450.

SWISHER, S. G., J. S. Economou, E. C. Holmes et S. H. Golub. 1990. «TNF-alpha and IFN-gamma reverse IL-4 inhibition of lymphokine-activated killer cell function». Cell Immunol, vol. 128, no. 2, p. 450-461.

Szabo, S. J., N. G. Jacobson, A. S. Dighe, U. Gubler et K. M. Murphy. 1995. «Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling». Immunity, vol. 2, no. 6, p. 665-675.

SZTEIN, M. B., P. S. Steeg, H. M. Johnson et J. J. Oppenheim. 1984. «Regulation of human peripheral blood monocyte DR antigen expression in vitro by lymphokines and recombinant interferons». J Clin Invest, vol. 73, no. 2, p. 556-565.

- TARTAGLIA, L. A. et D. V. Goeddel. 1992. «Two TNF receptors». Immunol Today, vol. 13, no. 5, p. 151-153.
- TEJADA-SIMON, M. V., Z. Ustunol et J. J. Pestka. 1999. «Effects of lactic acid bacteria ingestion of basal cytokine mRNA and immunoglobulin levels in the mouse». J Food Prot, vol. 62, no. 3, p. 287-291.
- THEZE, J. 1999. The cytokine network and immune function. Oxford ; New York, Oxford University Press.
- TISSIER, H. 1906. «Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin». C.R.Soc.Biol., vol. 60, no. p. 359-361.
- TOMINAGA, K., T. Yoshimoto, K. Torigoe, M. Kurimoto, K. Matsui, T. Hada, H. Okamura et K. Nakanishi. 2000. «IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells». Int Immunol, vol. 12, no. 2, p. 151-160.
- TRACEY, K. J., Y. Fong, D. G. Hesse, K. R. Manogue, A. T. Lee, G. C. Kuo, S. F. Lowry et A. Cerami. 1987. «Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia». Nature, vol. 330, no. 6149, p. 662-664.
- TRAPP, C. L., C. C. Chang, G. M. Halpern, C. L. Keen et G. M.E. 1993. «The influence of chronic yogurt consumption on populations of young and elderly adults». Int. J. Immunotherapy, vol. 9, no. 1, p. 53-64.
- TRINCHIERI, G. 1994. «Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes». Blood, vol. 84, no. 12, p. 4008-4027.
- VASSALLI, P. 1992. «The pathophysiology of tumor necrosis factors». Annu Rev Immunol, vol. 10, no. p. 411-452.
- VON der Weid, T., M. Kopf, G. Kohler et J. Langhorne. 1994. «The immune response to Plasmodium chabaudi malaria in interleukin-4- deficient mice». Eur J Immunol, vol. 24, no. 10, p. 2285-2293.
- WAGNER, R. D., T. Warner, L. Roberts, J. Farmer et E. Balish. 1997. «Colonization of congenitally immunodeficient mice with probiotic bacteria». Infect Immun, vol. 65, no. 8, p. 3345-3351.
- WANG, K. S., D. A. Frank et J. Ritz. 2000. «Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4». Blood, vol. 95, no. 10, p. 3183-3190.
- WU, C. Y., M. Gadina, K. Wang, J. O'Shea et R. A. Seder. 2000. «Cytokine regulation of IL-12 receptor beta2 expression: differential effects on human T and NK cells». Eur J Immunol, vol. 30, no. 5, p. 1364-1374.

YASUI, H., J. Kiyoshima, T. Hori et K. Shida. 1999. «Protection against influenza virus infection of mice fed *Bifidobacterium breve* YIT4064». Clin Diagn Lab Immunol, vol. 6, no. 2, p. 186-192.

YASUI, H., N. Nagaoka et K. Hayakawa. 1994. «Augmentation of anti-influenza virus hemagglutinin antibody production by Peyer's patch cells with *Bifidobacterium breve* YIT4064». Clin Diagn Lab Immunol, vol. 1, no. 2, p. 244-246.

Yoshimoto, T. et W. E. Paul. 1994. «CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3». J Exp Med, vol. 179, no. 4, p. 1285-1295.

ZHANG, T., K. Kawakami, M. H. Qureshi, H. Okamura, M. Kurimoto et A. Saito. 1997. «Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudate cells against *Cryptococcus neoformans* through production of gamma interferon by natural killer cells». Infect Immun, vol. 65, no. 9, p. 3594-3599.

ZOU, J., D. H. Presky, C. Y. Wu et U. Gubler. 1997. «Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases». J Biol Chem, vol. 272, no. 9, p. 6073-6077.

