

Université de Montréal

**Effets de dérivés de chitosane sur la production de
cytokines macrophagiques et adipocytaires dans
des modèles murin et aviaire**

Par

Alexia Monges

Département de microbiologie et d'immunologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en microbiologie et immunologie

Juin, 2006

© Alexia Monges, 2006



W
H
US8
2006
V765

116 032

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Effets de dérivés de chitosane sur la production de
cytokines macrophagiques et adipocytaires dans
des modèles murin et aviaire**

Présenté par :
Alexia Monges

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Lyne Gagnon
(président-rapporteur)

Lucie Lamontagne
(directrice de recherche)

Tatiana Scorza
(membre du jury)

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

L'ostéoarthrite (OA) est une maladie dégénérative des articulations qui entraîne de la douleur chronique et la perte fonctionnelle des articulations touchées. L'utilisation de médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens, tel que l'ibuprofène, ne renverse pas le processus dégénératif de la maladie. La compagnie ISM Biopolymer Inc. a mis au point de nouvelles molécules, le produit OligoviaTM et d'autres dérivés de chitosane d'après un procédé breveté. Etant donné le pouvoir immunomodulateur du chitosane, nous avons vérifié si les dérivés de chitosane de différents PM pouvaient moduler la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires dans différents modèles expérimentaux *in vivo* et *in vitro*. Afin de démontrer que les dérivés de chitosane de faible PM entraînent la production de cytokines suppressives, un modèle *in vivo* d'ostéoarthrite expérimentale a été utilisé. Des souris C57BL/6 ont reçu une injection de carragénine dans l'articulation fémoro-tibiale avant ou après avoir été traitées avec le produit OligoviaTM ou la glucosamine-HCl. Les observations préliminaires suggèrent que le produit OligoviaTM pourrait diminuer l'enflure plus efficacement que la glucosamine tout en modulant la production de la PGE₂ et de l'IL-10 dans le liquide synovial. Les effets *in vitro* des dérivés de chitosane de faible PM sur la production de cytokines par les macrophages péritonéaux, les lymphocytes spléniques et les adipocytes de la région paramétriale de souris C57BL/6 ont également été étudiés. Les résultats indiquent que certains dérivés de chitosane entraînent l'activation métabolique des lymphocytes en stimulant la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-6 et PGE₂ chez des macrophages péritonéaux mais diminuent la stimulation induite par des milieux conditionnés de macrophages activés par le peptidoglycan (PEP). Cet effet inhibiteur est associé à une diminution de cytokines inflammatoires et une augmentation d'IL-10 et de TGF- β 1 par l'OligoviaTM et la glucosamine. Ces résultats ont été accompagnés d'une diminution de l'activation du NF- κ B et non de la p38. Les dérivés de chitosane agissent aussi sur la production de leptine, de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-6 par les adipocytes. D'autre part, il a été proposé que les dérivés de chitosane de haut PM administrés par voie orale pouvaient agir comme immunostimulants. Cette hypothèse a été vérifiée dans le modèle aviaire. Les dérivés de chitosane de haut PM ont été testés sur des splénocytes de jeunes poussins et de poulets adultes. Les résultats montrent que les dérivés de haut PM ont augmenté la sous-population lymphocytaire CD4+CD8- et diminué les pourcentages relatifs de lymphocytes CD4-CD8+. De plus, les dérivés de haut PM stimulent la production d'INF- γ par les splénocytes tout en diminuant légèrement celle du TGF- β 1. Tous ces résultats mettent en évidence le potentiel immunomodulateur des dérivés de chitosane en fonction de leur taille, d'où leur intérêt dans le développement de nouveaux traitements contre les maladies inflammatoires ou encore comme nutraceutiques immunostimulants.

MOTS CLÉS : Ostéoarthrite, immunomodulation, dérivés de chitosane, cytokines, adipokines, macrophages, adipocytes, lymphocytes, aviaire, souris C57BL/6.

RÉSUMÉ EN ANGLAIS

Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease resulting in chronic pain and loss of function. Non steroidal anti-inflammatory drugs, such as ibuprofen, do not reverse the degenerative process of the disease. ISM Biopolymer Inc. has developed new molecules derived from chitosane, including Oligovia™, according to a patented process. Since the immunomodulatory properties of chitosane are well known, we propose to verify if the chitosane derivates of various MW can modulate the production of pro- and anti-inflammatory cytokines in various animal models. In order to illustrate that low MW chitosane derivates induce the production of suppressive cytokines, an *in vivo* experimental osteoarthritis was induced in C57BL/6 mice injected with carrageenan in the femorotibial joint before or after treatment with Oligovia™ or glucosamine. These results suggest that Oligovia™ could decrease swelling more effectively than glucosamine while modulating the production of PGE₂ and IL-10 in synovial fluids. The *in vitro* effects of low MW chitosan derivates on cytokine production by C57BL/6 mice peritoneal macrophages, splenic lymphocytes and adipocytes was also studied. Thus, the results show that some chitosan derivates increase lymphocyte activity and induce pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 and PGE₂ in non activated peritoneal macrophages while the effects were reversed in lymphocytes treated with conditioned media from peptidoglycan (PEP)-activated macrophages. IL-10 increased in activated macrophages when treated *in vitro* with Oligovia™ and glucosamine. Results also indicated that these derivates decreased NF- κ B activity but not p38. In this study we also proposed that high MW chitosan derivates may be immunostimulatory and would increase the immune response of young chickens. High MW chitosan derivates were tested on splenocytes from young and grown chicken. The results showed that high MW chitosan derivates increased the CD4+CD8- cell population and decreased the CD4-CD8+ lymphocytes. Moreover, these derivates induced INF- γ production by splenocytes while they decreased the TGF- β 1 production. Altogether these results suggest the immunomodulatory potential of chitosane derivates relatively to the size of the molecule, which could be of great interest in the elaboration of new treatments against inflammatory diseases or as nutraceutical immunostimulator.

KEY WORDS: Osteoarthritis, immunomodulation, chitosane derivates, cytokines, adipokines, macrophages, adipocytes, lymphocytes, avian, C57BL/6 mice.

TABLE DES MATIERES

PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY	ii
RÉSUMÉ EN FRANÇAIS	iii
RÉSUMÉ EN ANGLAIS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
Liste des tableaux et figures	ix
Liste des abréviations.....	xiii
REMERCIEMENTS	xvi
1-REVUE DE LA LITTÉRATURE	1
1.1- L'ostéoarthrite.....	2
1.1.1- Description de la pathologie	2
1.1.2- Structure de l'articulation	3
1.1.3- Processus inflammatoire de l'ostéoarthrite.....	3
1.1.3.1- Production de cytokines inflammatoires.....	4
1.1.3.1.1- Effets du TNF- α et de l'IL-1	5
1.1.3.2- Production de cytokines anti-inflammatoires	6
1.1.3.3- Interactions avec les cellules immunitaires	6
1.2- Le chitosane	7
1.2.1- Nature et origine	7
1.2.2- Propriétés physico-chimiques du chitosane.....	8
1.2.3- Propriétés biologiques du chitosane	8
1.2.3.1- Réparation tissulaire	8
1.2.3.2- Activité antimicrobienne	9
1.2.4- Propriétés pharmaceutiques du chitosane.....	10
1.2.5- Propriétés immunomodulatrices du chitosane	10
1.3- Les glucosamines.....	11
1.3.1- Absorption et métabolisme de la glucosamine chez l'humain	11
1.3.2- Toxicité de la glucosamine	12
1.3.3- Efficacité de la glucosamine	13
1.3.4- Effet de la glucosamine sur le métabolisme du glucose	13
1.3.5- Propriétés immunomodulatrices de la glucosamine	14
1.4- Structure et fonctions des cytokines	14
1.4.1- Le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α	16
1.4.2- L'interleukine-6 (IL-6)	16
1.4.3- L'interleukine-10 (IL-10)	17
1.4.4- L'interleukine-12 (IL-12)	17
1.4.5- L'interféron- γ (INF- γ).....	18
1.4.6- Le facteur de croissance β 1 des cellules transformées (TGF- β 1).....	18
1.4.7- La prostaglandine-E ₂ (PGE ₂).....	19
1.5- Rôles des macrophages, des lymphocytes et des adipocytes dans la réponse inflammatoire	19
1.5.1- Les macrophages	19
1.5.1.1- Activation des macrophages par le LPS et le PEP	20

1.5.2- Les lymphocytes T.....	22
1.5.3- Les adipocytes.....	23
1.5.3.1- Production de cytokines inflammatoires par les adipocytes.....	23
1.5.3.2- La leptine	23
1.6- Voies de signalisation intracellulaire.....	25
1.6.1- Le facteur nucléaire- κ B (NF- κ B).....	25
1.6.1.1- Rôles du NF- κ B dans la réponse inflammatoire.....	25
1.6.1.2- Régulation du NF- κ B et implications pour l'issue de la réponse immunitaire	27
1.6.2- Les protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK)	27
1.6.2.1- Rôles de la p38 dans la production de cytokines anti-inflammatoires	28
1.7- Immunité aviaire.....	28
1.7.1- Les maladies mucoales des jeunes poulets.....	29
1.7.1.1- La coccidiose	29
1.7.1.2- La salmonellose	30
1.7.1.3- La colibacillose.....	31
1.7.2- Les cytokines aviaires.....	32
1.7.3- Les macrophages aviaires	33
1.7.4- Les lymphocytes aviaires.....	33
1.7.4.1- Lymphocytes B.....	33
1.7.4.2- Lymphocytes T	34
1.7.5- Réponses Th1 et Th2 chez le poulet	34
1.7.6- Immunité mucoale du poulet.....	35
1.7.6.1- Le GALT.....	36
1.7.6.2- Fonctions effectrices associées au GALT.....	38
1.7.7- Pourquoi s'intéresser au modèle aviaire?	38
1.8- Hypothèses.....	39
2- MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	41
2.1- Souris.....	42
2.2- Poussins SPF.....	42
2.3- Poulets adultes	42
2.4- Dérivés de chitosane	42
2.5- Prélèvement des organes et isolement cellulaire	43
2.5.1- Prélèvement des macrophages péritonéaux	43
2.5.2- Prélèvement des cellules de la rate	43
2.5.3- Prélèvement des adipocytes	44
2.5.4- Prélèvement du liquide synovial et du sérum	44
2.6- Traitements <i>in vitro</i> des cellules avec les dérivés de chitosane.....	44
2.6.1- Traitement des macrophages avec les dérivés de chitosane	44
2.6.1.1- Macrophages péritonéaux et dérivés de chitosane de faible PM.....	44
2.6.1.2- Macrophages spléniques et dérivés de chitosane de haut PM ...	45
2.6.2- Traitement des lymphocytes spléniques avec les dérivés de chitosane... ..	45
2.6.2.1- Modèle murin (souris C57BL/6).....	45
2.6.2.2- Modèle aviaire (poussins SPF et poulets adultes)	46

2.6.3- Traitement des lymphocytes avec des surnageants de macrophages incubés avec des dérivés de chitosane	46
2.6.3.1- Modèle murin (souris C57BL/6).....	46
2.6.3.2- Modèle aviaire (poussins SPF et poulets adultes)	46
2.6.4- Traitement des adipocytes murins avec les dérivés de chitosane	47
2.7- Dosages des cytokines	47
2.7.1- Les cytokines macrophagiques	47
2.7.2- Les cytokines lymphocytaires.....	47
2.7.3- Les adipokines	48
2.8- Détermination des voies de signalisation activées par les dérivés de chitosane.....	48
2.9- Prolifération des lymphocytes spléniques en réponse aux dérivés de chitosane	48
2.9.1- Modèle murin (souris C57BL/6)	48
2.9.2- Modèle aviaire (poussins SPF et poulets adultes)	49
2.10- Doubles immunomarquages et analyse cytofluorométrique des populations lymphocytaires	49
2.11- Détermination de la cytotoxicité des dérivés de chitosane envers les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6	50
2.11.1- Détermination de la nécrose cellulaire.....	50
2.11.2- Détermination de l'apoptose cellulaire.....	50
2.12- Induction d'ostéoarthritis dans un modèle murin	51
2.12.1- Utilisation d'Oligovia TM comme traitement préventif.....	52
2.13- Analyses statistiques	52
3- RÉSULTATS.....	53
3.1- Effets des dérivés de chitosane dans un modèle d'ostéoarthritis murin	54
3.1.1- Effets des dérivés de chitosane sur l'enflure de l'articulation fémoro-tibiale induite par la carragénine à 1%.....	54
3.1.2- Production de cytokines par les dérivés de chitosane dans un modèle <i>in vivo</i> d'arthrite induite par la carragénine à 1%	59
3.2- Effets <i>in vitro</i> des dérivés de chitosane sur les macrophages murins.....	63
3.2.1- Détermination de la présence d'apoptose et/ou de nécrose dans les chitosane.....	63
3.2.2- Activation des lymphocytes spléniques de souris C57BL/6 en réponse aux dérivés de chitosane.....	65
3.2.3- Effets des dérivés de chitosane sur la sécrétion de cytokines par des macrophages péritonéaux de souris C57BL/6.....	66
3.2.3.1- Le TNF- α	66
3.2.3.2- L'IL-6.....	68
3.2.3.3- L'IL-12.....	69
3.2.3.4- L'IL-10.....	69
3.2.3.5- Le TGF- β 1	73
3.2.3.6- La PGE ₂	73
3.2.4- Détermination des voies de signalisation activées chez les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 par les dérivés de chitosane.....	76
3.2.5- Effets des dérivés de chitosane sur la production d'adipokines par les adipocytes de la région paramétriale de souris C57BL/6.....	77

3.2.6- Modulation de la production de leptine par les adipocytes de souris C57BL/6 traitées avec les dérivés de chitosane	82
3.3- Effets <i>in vitro</i> des dérivés de chitosane de haut PM sur les splénocytes dans un modèle aviaire	84
3.3.1- Effets <i>in vitro</i> des oligomères de chitosane de haut PM sur la transformation blastique dans un modèle aviaire.....	84
3.3.1.1- Poussins sans agents pathogènes spécifiques (SPF) âgés de 7 jours.....	84
3.3.1.2- Poussins SPF âgés de 14 jours.....	86
3.3.1.3- Poulets adultes	88
3.3.2- Analyse des sous-populations lymphocytaires spléniques	91
3.3.2.1- Analyse phénotypique des différentes sous-populations lymphocytaires CD3/CD8 et CD4/CD8 de la rate de poussins SPF âgés 14 jours traités <i>in vitro</i> avec différents dérivés de chitosane de haut PM	91
3.3.2.1.1- Lymphocytes non-activés	91
3.3.2.1.2- Lymphocytes en présence de LPS	95
3.3.2.2- Analyse phénotypique des différentes sous-populations IgM/TCR $\gamma\delta$ de la rate de poussins SPF âgés de 14 jours traités <i>in vitro</i> avec différents dérivés de chitosane de haut PM.....	98
3.3.2.3- Analyse phénotypique des différentes sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 de la rate de poulets adultes traités <i>in vitro</i> avec différents dérivés de chitosane de haut PM.....	99
3.3.3- Production de cytokines par les lymphocytes spléniques en réponse aux dérivés de chitosane de haut PM	99
3.3.3.1- Production d'INF- γ par les lymphocytes de poussins SPF âgés de 14 jours	102
3.3.3.2- Production de TGF- β 1 par les lymphocytes de poussins SPF âgés de 14 jours	104
3.3.3.3- Effet des dérivés de chitosane de haut PM sur la production de cytokines lymphocytaires (INF- γ et TGF- β 1) chez des poulets adultes.....	104
4- DISCUSSION.....	113
4.1- Effets <i>in vivo</i> des dérivés de chitosane dans un modèle d'ostéoarthrite induit par la carragénine	114
4.2- Effets des dérivés de chitosane sur les interactions cellulaires dans un modèle murin.	117
4.3- Effets des dérivés de chitosane dans la modulation de la réponse inflammatoire du poulet.....	123
4.4- Conclusions générales.....	125
4.5- Développements futurs	127
5- RÉFÉRENCES	128

 LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau I. Principales activités biologiques des cytokines anti- et pro-inflammatoires..	15
Tableau II. Tableau récapitulatif des effets <i>in vitro</i> des dérivés de chitosane de faible PM sur différentes fonctions immunitaires de souris C57BL/6.....	109
Tableau II (suite). Tableau récapitulatif des effets <i>in vitro</i> des dérivés de chitosane de faible PM sur différentes fonctions immunitaires de souris C57BL/6.....	110
Tableau III. Tableaux récapitulatif des effets <i>in vitro</i> des dérivés de chitosane de haut PM sur les fonctions immunologiques dans un modèle aviaire.....	111
Tableau III (suite). Tableaux récapitulatif des effets <i>in vitro</i> des dérivés de chitosane de haut PM sur les fonctions immunologiques dans un modèle aviaire.....	112
Figure 1. Induction des gènes de transcription par le LPS chez des monocytes.....	20
Figure 2. Mécanisme d'activation du NF- κ B.....	26
Figure 3. Évolution de l'enflure de l'articulation fémoro-tibiale de souris C57BL/6 injectées avec de la carragénine à 1% puis traitées oralement avec une solution de glucose, le dérivé de chitosane Oligovia TM à différentes concentrations (1/4X, 1X et 4X) et le chlorure de glucosamine.....	56
Figure 4. Évaluation qualitative des effets du glucose (1) du chlorure de glucosamine (2) et du dérivé de chitosane Oligovia TM (3) sur les coussinets plantaires de souris C57BL/6 72 hres (A) ,14jrs (B), 21 jrs (C) et 28 jrs (D) après l'injection de carragénine à 1%.....	57
Figure 5. Évolution de l'enflure (A) et par rapport au temps post-injection (jour 1) (B) de l'articulation fémoro-tibiale de souris C57BL/6 préalablement traitées avec le produit Oligovia TM et le chlorure de glucosamine durant 30 jours avant l'injection de carragénine à 1%	58
Figure 6. Production d'IL-6 (A) et de PGE ₂ (B) dans le liquide synovial de souris C57BL/6 lors d'une ostéoarthrite induite par la carragénine 1% précédé (préventif) ou suivi (curatif) de l'administration de différents dérivés de chitosane durant 30 et 28 jours respectivement. Glucose 1X n=4 (A), Oligovia TM 1/4X n=6 (B), Oligovia TM 1X n=5 (C), Oligovia TM 4X n=6 (D), Glucosamine 1X n=6 (E), Oligovia TM 4X n=5 (F) et Glucosamine 1X n=4 (G).....	60
Figure 7. Production d'IL-10 dans le liquide synovial de souris C57BL/6 lors d'une ostéoarthrite induite par la carragénine 1% précédé (préventif) ou suivi (curatif) de l'administration de l'Oligovia TM 4X ou de la glucosamine 1X durant 30 et 28 jours respectivement.....	62

- Figure 8. Cytotoxicité par nécrose (A) ou par apoptose différentielle par rapport au contrôle (B) induite par les produits D, W et B à différentes concentrations chez des macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 durant 24 hres.....64
- Figure 9. Activité métabolique des lymphocytes spléniques de souris C57BL/6 en présence de surnageants de macrophages péritonéaux non-stimulés (A) ou stimulés par le PEP (10 µg/ml) (B) en présence des différents dérivés de chitosane sur un période de 48 hres.....67
- Figure 10. Production de TNF- α par les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 non-stimulés (A) ou stimulés par le PEP (10 µg/ml) (B) en présence des différents dérivés de chitosane durant 24 hres.....70
- Figure 11. Production d'IL-6 par les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 non-stimulés (A) ou stimulés par le PEP (10 µg/ml) (B) en présence des différents dérivés de chitosane durant 24 hres.....71
- Figure 12. Production d'IL-10 par les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 non-stimulés (A) ou stimulés par le PEP (10 µg/ml) (B) en présence des différents dérivés de chitosane durant 24 hres.....72
- Figure 13. Production de TGF- β 1 par les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 en présence des différents dérivés de chitosane durant 24 hres.....74
- Figure 14. Production de PGE₂ par les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 non-stimulés (A) ou stimulés par le PEP (10 µg/ml) (B) en présence des différents dérivés de chitosane durant 24 hres.....75
- Figure 15. Dosage du NF- κ B (A) et de la p38 (B) dans les lysats cellulaires de macrophages péritonéaux C57BL/6 activés par le PEP (10 µg/ml) et traités avec différents dérivés de chitosane à un concentration de 10 µg/ml durant 24 hres.....78
- Figure 16. Production de TNF- α (A) d'IL-6 (B) d'IL-1 β (C) et de PGE₂ (D) par les adipocytes (région paramétriale) de souris C57BL/6 en présence de différents dérivés de chitosane durant 24 hres.80
- Figure 16 (suite). Production de TNF- α (A) d'IL-6 (B) d'IL-1 β (C) et de PGE₂ (D) par les adipocytes (région paramétriale) de souris C57BL/6 en présence de différents dérivés de chitosane durant 24 hres.81
- Figure 17. Production de leptine par les adipocytes (région paramétriale) de souris C57BL/6 en présence de surnageants de macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 non-stimulés (A) ou stimulés par le PEP (10 µg/ml) (B) en présence des différents dérivés de chitosane durant 24 hres.....83

- Figure 18. Activité métabolique des lymphocytes spléniques de poussins SPF âgés de 7 jours par différents dérivés de chitosane de haut PM durant 24 hres.85
- Figure 19. Activité métabolique des lymphocytes spléniques de poussins SPF âgés de 14 jours en absence (A) ou en présence (B) de LPS (0,5 µg/ml) et traités avec différents dérivés de chitosane de haut PM durant 24 hres.....87
- Figure 20. Activité métabolique des lymphocytes spléniques de poussins SPF âgés de 14 jours mis en contact durant 48 hres avec des surnageants de macrophages spléniques traités avec les dérivés de chitosane de haut PM durant 24 hres.....89
- Figure 21. Activité métabolique des splénocytes de poulets adultes traités avec différents dérivés de chitosane de haut PM durant 24 hres.....90
- Figure 22. Analyse phénotypique des sous-populations CD4/CD8 de la rate de poussins SPF âgés de 14 jours non-stimulées (A), stimulées par la ConA (50 µg/ml) (B) et traitées avec le produit W (80 µg/ml) (C) durant 24 hres.92
- Figure 23. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 et CD3/CD8 spléniques de poussins SPF âgés de 14 jours traitées avec du LPS (0,5 µg/ml) ou de la ConA (50 µg/ml) (A), ou avec différents dérivés de chitosane (B = produit G ; C = produit W ; D = produit E ; E = produit 12R ; F = produit 18R ; G = produit X1 ; H = produit Y1) pendant 24hres.....93
- Figure 23 (suite). Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 et CD3/CD8 spléniques de poussins SPF âgés de 14 jours traitées avec du LPS (0,5 µg/ml) ou de la ConA (50 µg/ml) (A), ou avec différents dérivés de chitosane (B = produit G ; C = produit W ; D = produit E ; E = produit 12R ; F = produit 18R ; G = produit X1 ; H = produit Y1) pendant 24hres.....94
- Figure 24. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 et CD3/CD8 spléniques de poussins SPF âgés de 14 jours préalablement stimulées avec du LPS (0,5 µg/ml) et traitées avec différents dérivés de chitosane (A = produit W ; B = produit E ; C = produit G ; D = produit 12R ; E = produit 18R ; F = produit X1 ; G = produit Y1) pendant 24hres.....96
- Figure 24 (suite). Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 et CD3/CD8 spléniques de poussins SPF âgés de 14 jours préalablement stimulées avec du LPS (0,5 µg/ml) et traitées avec différents dérivés de chitosane (A = produit W ; B = produit E ; C = produit G ; D = produit 12R ; E = produit 18R ; F = produit X1 ; G = produit Y1) pendant 24hres.....97
- Figure 25. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 spléniques de poulets adultes traités avec différents dérivés de chitosane (A = produit W ; B = produit E ; C = produit G ; D = produit 12R ; E = produit 18R ; F = produit X1 ; G = produit Y1) pendant 24hres.....100

Figure 25 (suite). Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 spléniques de poulets adultes traités avec différents dérivés de chitosane (A = produit W ; B = produit E ; C = produit G ; D = produit 12R ; E = produit 18R ; F = produit X1 ; G = produit Y1) pendant 24hres.....101

Figure 26. Production d'INF- γ par les lymphocytes spléniques de poussins SPF âgés de 14 jours non-stimulés (A) ou stimulés avec du LPS (0,5 μ g/ml) (B) en présence de dérivés de chitosane de haut PM durant 24 hres.....103

Figure 27. Production de TGF- β 1 par les lymphocytes spléniques de poussins SPF âgés de 14 jours en présence de dérivés de chitosane de haut PM pendant 24 hres.....105

Figure 28. Production d'INF- γ (A) et de TGF- β 1 (B) par les lymphocytes spléniques de poulets adultes en présence de dérivés de chitosane de haut PM durant 24 hres.....106

Figure 29. Production d'INF- γ (A) et de TGF- β 1 (B) par les lymphocytes spléniques de poulets adultes activés par du LPS (0,5 μ g/ml) en présence de dérivés de chitosane de haut PM durant 24 hres.....108

LISTE DES ABRÉVIATIONS

a.a.: Acides aminés
AC : Amygdales caecales
ADN : Acide désoxyribonucléique
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
PA-1 : Protéine activatrice-1
APEC : *E. coli* aviaire pathogène
ARNm: Acide ribonucléique messenger
°C : degré Celcius
CD : Groupe de différenciation (cluster differentiation)
ChIL : Interleukine du poulet
ChINF : Interféron du poulet
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CO₂: Dioxyde de carbone
ConA : Concanavaline A
COX : Cyclooxygénase
CPA : Cellules présentatrices d'antigènes
CSF : Facteur de croissance de colonies (colony stimulating factor)
Da : Dalton
D.O. : Densité optique
EGF : Facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor)
ENA-78 : peptide dérivé des cellules endothéliales activant les neutrophiles
EP : Récepteur des prostaglandines –E
ERK : Kinases régulées par des signaux extracellulaires (extracellular-regulated kinase)
Fc: Fragment cristallisable
FITC : Isothiocyanate de fluorescéine (fluorescein isothiocyanate)
fMLP : N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine
FSC : (Forward scatter)
g : Gramme
GALT : Tissus lymphoïdes associés au système digestif (gut-associated lymphoid tissue)
GlcN : Glucosamine
GlcNAc : N-acétylglucosamine
GLUT : Transporteur protéique de glucose (glucose transport protein)
GM-CSF : Facteur de croissance de colonies granulocytaires et macrophagiques (granulocyte-macrophage-colony stimulation factor)
gp : Glycoprotéine
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
Hag B : Hémagglutinine B
HCl : hydrochlorure
HLA : Antigènes leucocytaires humains (human leukocyte antigen)
Hres : Heures
ICAM : Molécule d'adhésion intercellulaire (intracellular adhesion molecule)
Ig: Immunoglobuline
IGF : Facteur de croissance de type insuline (insulin-like growth factor)
IκB : Inhibiteur du NF-κB
IL : Interleukine

IL-1R : Récepteur de l'IL-1
INF : Interféron
iNOS : Synthétase inductible de l'oxide nitrique (inductible nitric oxide synthase)
JNK : kinases c-Jun N-terminal (Jun-kinase)
kDa : Kilo Dalton
LBP : Protéine liant le LPS (LPS binding protein)
LCM : Culture lymphocytaire mixte
LDH : Lactate déshydrogénase
LFA : Antigène associé à la fonction lymphocytaire (leukocyte function antigen)
LP : Lamina propria
LPS : Lipopolysaccharides
M : Molaire
MAC-1 : Récepteur pour les fragments du complément
MALT : Tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (mucosal-associated lymphoid tissue)
MAPK : Protéines kinases activées par des mitogènes (mitogen activated protein kinase)
MCP : Chimiochine attirant les macrophages
MD-2 : Protéine associée au récepteur Toll-4
mg : Milligramme
mg/kg : Milligramme par kilogramme
mg/ml : Milligramme par millilitre
MIF : Facteur d'inhibition de la migration des macrophages (macrophage inhibiting factor)
MIP : Protéine inflammatoire macrophagique (macrophage inflammatory protein)
ml : Millilitre
mm : Millimètre
MMP : Métalloprotéinase de la matrice (matrix metalloproteinase)
MTS/PMS : (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium inner salt/ phenazine methosulfate
NALT : Tissus lymphoïdes nasaux (nasal associated lymphoid tissue)
NDV : Virus de la maladie de Newcastle (Newcastle disease virus)
NF- κ B : Facteur nucléaire- κ B (nuclear factor- κ B)
NK : cellules tueuses naturelles (Natural killer)
NT : neurotrophine
nm : Nanomètre
NO : oxide nitrique (nitric oxide)
NSAID : Médicament anti-inflammatoire non stéroïdien (non steroidal anti-inflammatory drugs)
NT : Neurotrophine
OA : Ostéoarthrite
PAF : Facteur activateur des plaquettes (platelet activating factor)
PBS : Tampon phosphate
PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes (platelet derivated growth factor)
PE : Phycoérythrine
PEP : Peptidoglycan
PG : Prostaglandines
PGE : Prostaglandine-E

pg/ml : picogramme par millilitre
PGRP : Protéines de reconnaissance du PEP (PEP-recognition proteins)
pH : potentiel d'hydrogène
PHA : Phytohémagglutinine
pKa : Constante de dissociation
PKC: Protéine kinase C
PIGF : Facteur de croissance placentaire (placental growth factor)
PM : Poids moléculaire
PMSF : Phénylméthylsulphonylfluoride
PP : Plaques de Peyer
ppm : Parties par million
PWM : (Pokeweed mitogen)
ROI : Réactif intermédiaire oxygéné (reactive oxygen intermediates)
RON: Réactif intermédiaire azoté (reactive nitrogen intermediates)
RPM: Rotation par minute
SPF: exempt d'agents pathogènes spécifiques (specific pathogen free)
Src : Tyrosine kinase
SSC : (Side scatter)
SVF : Sérum de veau fœtal
TCR : Récepteur des lymphocytes T (T-cell receptor)
TGF : Facteur de croissance des cellules transformées (transforming growth factor)
Th : Lymphocyte T auxiliaire (T helper cells)
TLR : Récepteur Toll (toll-like receptor)
TNF : Facteur de nécrose tumorale (tumor necrosis factor)
TNFR : Récepteur du TNF (TNF receptor)
TPA : Activateur du plasmogène tissulaire (tissue plasminogen activator)
TPO : Thrombopoïétine
U/ml : Unité/millilitre
 $\mu\text{g}/\text{kg}$: Microgramme par kilogramme
 $\mu\text{g}/\text{ml}$: Microgramme par millilitre
 $\mu\text{g}/\text{U}$: Microgramme par unité
 μl : Microlitre
 μm : Micromètre
VCAM : Molécules d'adhésion cellulaire vasculaire (vascular cell adhesion molecule)
WAT : Tissu adipeux blanc (white adipose tissue)

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, Dr Lucie Lamontagne, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir si chaleureusement encadrée et appuyée lors de cette maîtrise. Je voudrais la remercier de m'avoir confié ce projet de recherche et surtout pour avoir crû en mes capacités. Merci d'avoir toujours trouvé le temps de m'écouter et pour avoir toujours eu des bons conseils, autant au plan professionnel que personnel.

Je remercie le Dr Roland Savard qui m'a donné ma première chance en tant que stagiaire et avec qui j'ai eu le plaisir de travailler lors de ma maîtrise. Merci de m'avoir permis d'élargir mes connaissances et de toujours avoir privilégié l'ouverture et la rigueur scientifique dans son laboratoire.

Je voudrais également remercier le Dr Isabelle Boucher et Serge Bruner Ing. d'ISM Biopolymer Inc. pour m'avoir permis de découvrir la recherche en entreprise, ce qui a été déterminant dans le choix de mon orientation professionnelle après la maîtrise. J'aimerais également remercier le Dr Nathalie Côté et toute l'équipe technique d'ISM Biopolymer Inc. pour leur assistance et leur gentillesse.

Je souhaite remercier tout particulièrement l'assistant de recherche Christian Bleau sans qui les deux dernières années auraient été bien tristes. Merci pour l'amitié et la complicité, pour les fous rires, merci d'avoir travaillé si souvent sous la hotte et d'avoir répondu à mes nombreuses questions sans jamais perdre patience. D'un point de vue plus personnel, merci pour tout le soutien que tu m'as procuré tout au long de ma maîtrise, merci d'avoir crû en moi, et surtout merci d'avoir été là lors de mes nombreuses remises en question et moments d'incertitudes. Te connaître m'a beaucoup apporté à tous les points de vue.

Je remercie aussi les étudiants Annie Gosselin, Alexandre Jacques et Luciana Poggi et ma stagiaire Schahra pour leur soutien technique et pour avoir contribué à rendre l'atmosphère amicale dans le laboratoire.

1- REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1- L'ostéoartrite

1.1.1- Description de la pathologie

L'ostéoartrite (OA) est une maladie dégénérative des articulations, causant une diminution de l'espace articulaire et des changements dans le tissu osseux sous-jacent. En 1997, cette maladie affectait approximativement 12% de la population des États-Unis. Son incidence augmente avec l'âge et elle est plus élevée chez les femmes que chez les hommes, dans un rapport de deux pour un (Hawker, 1997).

L'OA entraîne des douleurs importantes et la perte de fonction des articulations touchées. Plusieurs produits sont utilisés pour soulager la douleur associée à l'OA, incluant les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAID) (e.g. ibuprofène), l'acétaminophène et les analgésiques opioïdes. Les NSAID ont des effets à la fois positifs et négatifs sur le métabolisme du cartilage. Ils préviennent l'activation d'enzymes ostéolytiques en inhibant les cyclooxygénases (Howell *et al.*, 1982). Par contre, des études sur l'ibuprofène et la fénoprofène ont montré que ces molécules réduisaient la synthèse de glycosaminoglycanes impliquées dans la protection du cartilage. L'effet cumulatif des NSAID sur le métabolisme du cartilage chez l'humain n'est pas encore connu, mais il a clairement été démontré que l'acétaminophène et les NSAID ne renversent pas le processus dégénératif de l'OA (Palmoski et Brandt, 1980).

Il semble donc important de se tourner vers d'autres molécules chondroprotectrices telles que la glucosamine. En effet, la glucosamine stimule la production de protéoglycanes et augmente la prise de sulfate par le cartilage articulaire (Bassleer *et al.*, 1992). La glucosamine administrée sous forme de sel de sulfate fournie au cartilage des précurseurs d'hexosamines et des groupements sulfates nécessaires à la synthèse des protéoglycanes (Barclay *et al.*, 1998).

1.1.2- Structure de l'articulation

La cavité articulaire est tapissée de cartilage recouvrant les surfaces articulaires ainsi que les membranes synoviales localisées en périphérie. La membrane synoviale ne possède pas de couche basale ni de cellules épithéliales (Hasselbacher, 1981) mais contient par contre un réseau vasculaire très riche facilitant les échanges rapides d'eau et de solutés, favorisant ainsi le rôle physiologique actif de la membrane synoviale (Schumacher, 1969). Toutes les articulations diarthroïdiales contiennent de faibles quantités de liquide synovial provenant du plasma, préalablement filtré par le réseau de capillaires, pour ensuite être diffusé dans la cavité articulaire où il est enrichi d'acides hyaluroniques synthétisés localement (Mc Cutchen, 1981). Le liquide synovial est également composé de chondrocytes (10% du volume cartilagineux) qui assurent le renouvellement de la matrice en utilisant des enzymes de digestion.

La cavité articulaire contient également des protéoglycanes et des glycosaminoglycanes composées d'unités disaccharidiques répétées qui sont une combinaison d'acides hexuroniques (acide D-glucuronique, acide iduronique, ou L-galactose) et d'hexosamines (D-glucosamine ou D-galactosamine). Les protéoglycanes lient l'eau et les cations pour former une couche élastique et visqueuse qui agit comme lubrifiant, protégeant ainsi le cartilage en lui conférant une résistance au stress mécanique. Les fonctions de la membrane et du liquide synovial incluent le transport des nutriments au cartilage non vascularisé, l'aide à la lubrification et à la protection de l'articulation (Junqueira *et al.*, 1992).

1.1.3- Processus inflammatoire de l'ostéoarthrite

La destruction des tissus affectés dans la pathologie de l'OA résulte de la dégradation accrue de la matrice cartilagineuse conjointement à la réduction de la synthèse des composants de la matrice par les chondrocytes (Westacott et Sharif, 1996). Le bon fonctionnement des chondrocytes est assuré par plusieurs facteurs de croissance produits par les cellules-mêmes. Ceux-ci incluent le facteur de croissance épidermique (EGF), la thrombopoïétine (TPO), le facteur de croissance placentaire (PIGF) et les

neurotrophines-3 et -4 (NT-3, NT-4). En plus de produire des facteurs de croissance et d'angiogénèse, les chondrocytes produisent un grande variété de chimiokines dont l'ENA-78 (CXCL5) et la MCP-2 (CCL8) et MIP-3 α (CCL20). Les chimiokines sont des médiateurs impliqués dans la pathophysiologie de plusieurs maladies inflammatoires incluant l'arthrite rhumatoïde. Les chondrocytes produisent également des cytokines inflammatoires impliquées dans l'OA, soit le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α , l'interleukine (IL)-1, l'IL-6, l'IL-12, l'IL-16 et le facteur d'inhibition de la migration des macrophages (MIF) (De Ceuninck *et al.*, 2004).

1.1.3.1- Production de cytokines inflammatoires

La dégradation de la matrice observée dans l'OA est médiée par les chondrocytes activés par des cytokines inflammatoires. Il semblerait que les cytokines et les facteurs de croissance soient impliqués dans la régulation de la dégradation ainsi que dans la synthèse du cartilage. En effet, certains facteurs de croissance tels que le facteur de croissance de type insuline (IGF), les facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance des cellules transformées- β (TGF- β) auraient la capacité de stimuler la production de nouveau cartilage (Guerne *et al.*, 1994). Toutefois, certaines cytokines ont à l'inverse un effet inhibiteur. Ainsi, il a été démontré que l'IL-1 et le TNF- α , deux cytokines pro-inflammatoires dérivées du tissu synovial et produites plus abondamment par les chondrocytes, provoquent l'inhibition de la synthèse de protéoglycanes par les chondrocytes (Melchiorri *et al.*, 1998). L'IL-12, une cytokine inflammatoire produite par les cellules phagocytaires, les cellules dendritiques, les cellules NK et les lymphocytes B en réponse à une stimulation bactérienne ou par le LPS, joue également un rôle important dans l'inflammation synoviale. En effet, Joosten *et al.* (2002) ont montré que la surexpression locale d'IL-12 transforme un modèle expérimental d'arthrite aiguë en un processus dégénératif chronique mené par le système immunitaire.

1.1.3.1.1- Effets du TNF- α et de l'IL-1

Des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 et le TNF- α seraient impliquées dans l'OA en induisant l'expression de protéases dégradant la matrice, les métalloprotéinases de la matrice (MMP), chez les chondrocytes et ce, de façons autocrine et paracrine. En effet, les chondrocytes sont particulièrement sensibles aux effets du TNF- α et de l'IL-1 et produisent à leur contact des MMP et des métabolites réactifs comme l'oxide nitrique (NO) (Büttner *et al.*, 1997). L'IL-1 entraîne aussi d'autres effets sur le métabolisme des chondrocytes. Ainsi, il réduit considérablement l'expression de gènes anaboliques, comme celui du collagène de type II, et régule à la hausse l'expression des MMP-1, -3 et -13 (Bau *et al.*, 2002). L'IL-1 induit également l'expression de l'IL-6 et agit de façon synergique avec cette dernière dans l'inhibition de la production de protéoglycanes par les chondrocytes (Nietfeld *et al.*, 1990). Des études immunohistochimiques ont confirmé que le tissu synovial provenant de patients atteints d'OA précoce était infiltré par des cellules mononucléées et contenait des cytokines pro-inflammatoires (Young *et al.*, 2001). Ceci suggère donc que l'inflammation du tissu synovial serait un facteur important de l'OA.

Benito *et al.* (2004) ont montré que l'inflammation est beaucoup plus importante durant la phase précoce de l'OA. Ainsi, l'infiltration de cellules mononucléées et la formation de vaisseaux sanguins suite à l'expression de médiateurs pro-inflammatoires et de facteurs de transcription nucléaire étaient augmentées.

Des niveaux élevés d'IL-1 et de TNF- α ont été retrouvés dans le liquide synovial de patients atteints d'OA (Poole et Howell, 2001). Afin d'assurer leur action spécifique, le TNF- α et l'IL-1 doivent reconnaître et interagir avec leurs récepteurs membranaires. Le TNF- α reconnaît deux récepteurs, le TNFRp55 et TNFRp75. Le récepteur p55 présente une expression constitutive faible alors que le récepteur p75 est fortement inductible par différents médiateurs incluant les cytokines inflammatoires (Vandenabeele *et al.*, 1995). L'IL-1 possède également deux récepteurs, l'IL-1RI et l'IL-1RII (Sims *et al.*, 1988). Silvestri *et al.* (2005) ont montré une sur-expression des récepteurs TNFRp75, IL-1R et IL-1RII dans le cartilage de patients atteints d'OA. De

plus, l'IL-1 β induit la production de NO et de prostaglandine E₂ (PGE₂) par les chondrocytes (Amin, 1999). Aussi, l'IL-18 favorise la perte de protéoglycanes, *in vivo* et *in vitro*, en induisant la production d'IL-1 par les chondrocytes (Joosten *et al.*, 2004).

Le rôle pathologique du TNF- α et de l'IL-1 a été démontré par le fait que la destruction du cartilage, via la dégradation du collagène de type II et des protéoglycanes, peut être arrêtée en bloquant l'activité de ces cytokines (Kobayashi *et al.*, 2005).

1.1.3.2- Production de cytokines anti-inflammatoires

Malgré la présence des cytokines pro-inflammatoires, des cytokines anti-inflammatoires sont retrouvées dans le liquide synovial de patients atteints d'OA. Certaines cytokines, telles que l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 connues pour inhiber l'activité des cytokines pro-inflammatoires, ont été retrouvées en quantités élevées dans le liquide synovial de patients atteints de la maladie (Martel-Pelletier *et al.*, 1999). Ces cytokines préviendraient et corrigeraient la dégradation du cartilage notamment en supprimant la synthèse de TNF- α et d'IL-1 (Fernandes *et al.*, 2002). Ainsi, l'état d'activation des chondrocytes est contrôlé par un réseau complexe de cytokines et l'équilibre dans les quantités de cytokines anti- et pro-inflammatoires produites détermine la sévérité des dommages des tissus cartilagineux.

1.1.3.3- Interactions avec les cellules immunitaires

D'autres cellules sont également impliquées dans la pathologie de l'OA en produisant de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires. C'est le cas des monocytes et des synoviocytes qui relâchent, entre autre, du TNF- α , de l'IL-1 et de l'IL-8 dans le synovium (Arend et Dayer, 1995).

Sakkas *et al.* (1998) ont rapporté la présence de lymphocytes T activés de manière spécifique dans les infiltrats inflammatoires des membranes synoviales obtenues chez des patients atteints d'OA. Etant donné la nature chronique de l'inflammation, la présence de lymphocytes T dans de tels infiltrats n'est pas surprenante. En effet, des agrégats de lymphocytes T ont été retrouvés chez près de 65% des patients atteints de la

maladie. Ces lymphocytes présentent à leur surface des marqueurs d'activation précoces (CD69), intermédiaires (CD25 et CD38) et tardifs (CD45RO) et des molécules du HLA de classe II. La détection des marqueurs précoces et intermédiaires chez des lymphocytes suggère que ces cellules résidaient dans la membrane synoviale au moment de leur activation par des antigènes environnementaux ou des auto-antigènes déposés dans le tissu synovial. De plus, un nombre limité de clones de lymphocytes T activés prédominent dans le tissu synovial de patients atteints d'OA (Stamenkovic *et al.*, 1988).

Chez approximativement 50% des patients atteints d'OA, les lymphocytes T associés à la membrane synoviale produisent de l'IL-2 (activation des lymphocytes T) et de l'interféron (INF)- γ (activation des macrophages à produire des cytokines inflammatoires) mais pas d'IL-4, indiquant une réponse de type Th1 (Sakkas *et al.*, 1998). L'INF- γ contribue également à l'inflammation en induisant l'expression de molécules d'HLA de classe II à la surface des chondrocytes et en diminuant la synthèse du collagène (Fife, 1997).

Les rôles importants des cytokines inflammatoires dans le processus de l'OA suggèrent qu'il serait possible de diminuer ou de contrôler l'inflammation par des substances modulant les cytokines pro- et anti-inflammatoires.

1.2- Le chitosane

1.2.1- Nature et origine

La chitine est le deuxième polymère le plus abondant dans la nature après la cellulose. Ce polysaccharide est le principal constituant de l'exosquelette des insectes et des crustacés, ainsi qu'un composant important de la paroi cellulaire de certaines bactéries et champignons. Le chitosane est le produit de la déacétylation alcaline partielle de la chitine. Ce polymère est composé d'unités de D-glucosamine (GlcN) et de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) qui peuvent engendrer une grande diversité de molécules dont le poids moléculaire (PM) peut varier de 10 000 à 2 millions de Daltons (Da) (Senel *et al.*, 2000). La chitine et son dérivé, le chitosane, grâce à leur nature

biodégradable et biocompatible, sont déjà largement utilisés dans différents domaines comme l'agriculture, le traitement des eaux usées, les cosmétiques, l'alimentation et les suppléments alimentaires pour n'en nommer que quelques uns. De plus, leur caractère non toxique et hypoallergène permet leur utilisation comme biomatériau dans le domaine médical (Singla et Chawla, 2001).

1.2.2- Propriétés physico-chimiques du chitosane

Le chitosane est insoluble à pH neutre ou basique, mais forme des sels solubles dans l'eau au contact d'acides organiques ou inorganiques comme l'acide acétique ou l'acide lactique à un pH inférieur à 6. C'est lors de sa dissolution en milieu acide que le chitosane acquiert sa charge positive. Les propriétés physico-chimiques du chitosane varient en fonction de la nature de la molécule, et de ses degrés de déacétylation et de dépolymérisation. Le degré d'acétylation représente la proportion d'unités de GlcNAc au sein de la molécule. Ainsi, les propriétés du chitosane, telles que son pKa et sa solubilité, peuvent être modifiées en changeant le degré de déacétylation (Kristl *et al.*, 1993).

1.2.3- Propriétés biologiques du chitosane

1.2.3.1- Réparation tissulaire

Le chitosane est déjà utilisé en tant que biomatériau pour produire des gels qui sont employés dans le traitement des plaies. Etant donné que la molécule de chitosane est polycationique en environnement acide, elle possède la capacité de former des gels à pH acide grâce à son caractère hydrophile et peut ainsi retenir l'eau dans sa structure. Ces gels ainsi formés, grâce à leur grande hydratation, leurs propriétés physico-chimiques, ainsi que leur comportement polyélectrolytique, peuvent être utilisés comme pansements bioactifs pour la cicatrisation (Vachoud *et al.*, 2000). L'action régénératrice du chitosane découle de sa capacité à adhérer aux fibroblastes et à favoriser la prolifération des kératinocytes menant à la régénération de l'épiderme. Toutefois, le caractère régénérateur du chitosane n'est obtenu qu'avec les molécules ayant un faible degré de

déacétylation car il a été démontré que plus le degré de déacétylation est élevé, moins bonne est l'adhésion aux cellules et la prolifération de celles-ci (Chatelet *et al.*, 2001). Depuis 1985, Minami et son équipe ont démontré que le chitosane, en plus de son rôle dans la régénération tissulaire, diminue la fréquence des traitements et procure une protection confortable et sans douleur à la surface meurtrie. Ils ont également démontré la capacité du polymère à activer les défenses de l'hôte pour prévenir les infections, introduisant ainsi une alternative à l'utilisation des antibiotiques (Shigemasa et Minami, 1995). En effet, le chitosane augmente les fonctions des cellules inflammatoires. Les cellules ciblées par le polysaccharide sont les leucocytes polymorphonucléés (phagocytose, production d'ostéopontines et de la leukotriène B4) et les macrophages (phagocytose, production d'IL-1, de TGF- β 1 et de PDGF). Le chitosane induit également la production d'IL-8 par les fibroblastes, cytokine qui est impliquée dans la migration et la prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales vasculaires (Ueno *et al.*, 2001).

1.2.3.2- Activité antimicrobienne

Des études ont démontré que le chitosane inhibe la prolifération bactérienne dans les plaies infectées (Mi *et al.*, 2003). L'activité bactéricide du polymère est influencée par plusieurs facteurs, notamment le type de chitosane utilisé. En effet, le chitosane présente une activité antibactérienne plus forte que les oligomères de chitosane. Toutefois, les effets bactéricides sont influencés par le PM du chitosane, son degré de polymérisation et la nature même de la bactérie ciblée. En effet, l'activité antibactérienne du chitosane, optimale à pH acide, est généralement plus forte envers les bactéries Gram négatives que les Gram positives en raison de la plus grande hydrophilicité des bactéries Gram négatives (No *et al.*, 2003). L'activité bactéricide du chitosane proviendrait de son interaction avec la surface de la bactérie altérant ainsi sa perméabilité. Toutefois, l'hydrophilicité des bactéries Gram négatives ne peut expliquer à elle seule l'activité antibactérienne puisque les effets bactéricides du chitosane varient selon les espèces de bactéries Gram négatives. La densité des charges négatives présentes à la surface du pathogène est un facteur important. Ainsi, plus la charge négative à la surface de la bactérie est forte, plus la quantité de chitosane chargé

positivement adsorbée par la cellule sera grande, ce qui résultera en de plus importants changements au sein des structures de la paroi bactérienne et de la perméabilité de la membrane, menant ainsi à sa mort (Chung *et al.*, 2004).

L'activité antibactérienne du chitosane permet ainsi son utilisation dans l'industrie alimentaire en tant qu'agent de conservation pour prévenir les désordres de santé associés à la consommation d'aliments contaminés par des agents bactériens (Chun *et al.*, 1999).

1.2.4- Propriétés pharmaceutiques du chitosane

Le chitosane est un polymère dit mucoadhésif. Une fois avalé, le polysaccharide a la capacité d'adhérer aux tissus durs et mous, ce qui a amené son utilisation en dentisterie, en ophtalmologie et dans des procédures chirurgicales. Le chitosane adhère aux tissus épithéliaux et au mucus présent à la surface des tissus. Le chitosane est utilisé pour la libération mucosale de médicaments, de peptides, de protéines, de vaccins et d'ADN. Des tests cliniques ont également démontré qu'aucune réaction inflammatoire ou allergique n'a suivie l'injection, l'implantation, l'application ou encore l'ingestion de chitosane (Chatelet *et al.*, 2001).

Le chitosane est utilisé en milieu médical dans la production de la peau artificielle et de vaisseaux sanguins, et lors des sutures chirurgicales. Ses propriétés bioactives incluent le contrôle du cholestérol sanguin, l'inhibition des tumeurs de la muqueuse orale et la régulation de l'homéostasie. Il possède également des activités anti-inflammatoires et anti-virales et semble avoir un effet sur la perte de poids (Senel et McClure, 2004). De plus, l'utilisation de chitosane de haut PM dans des études cliniques a permis de démontrer son rôle dans la prévention de l'hypercholestérolémie, du diabète, de l'obésité et du cancer (Singla et Chawla, 2001).

1.2.5- Propriétés immunomodulatrices du chitosane

Certains oligochitosanes, tels que le N-acétylchitohexaose et le chitohexaose augmentent l'activité des cellules NK chez des souris porteuses de tumeurs (Kobayashi

et al., 1990). De plus, les oligochitosanes ayant un PM compris entre 1 et 3 kDa et 3 et 5 kDa préviennent le stress oxydatif chez la souris (Shon *et al.*, 2002). Ce polysaccharide est aussi capable d'activer les leukocytes *in vitro* et *in vivo* résultant en différents effets dépendant du statut métabolique de la cellule (Porporatto *et al.*, 2004).

Porporatto *et al.* (2004) ont montré que le chitosane, co-administré avec des protéines antigéniques, altérait la prise et/ou la distribution de l'antigène en plus d'augmenter la sécrétion de cytokines régulatrices associées à une stimulation antigénique. Les effets pourraient résulter de la capacité du chitosane à inhiber la surproduction de PGE₂, l'expression et l'activité de la COX-2 ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-1 β chez les macrophages activés par LPS. Toutefois, Yu *et al.* (2004) ont plutôt montré que le chitosane induisait la synthèse du TNF- α et du NO chez les macrophages en absence d'une activation par le LPS. Cette synthèse serait induite via l'activation du facteur de transcription nucléaire (NF)- κ B. Le chitosane stimulait également la production de cytokines anti-inflammatoires, telle que l'IL-10, chez ces cellules (Chou *et al.*, 2003).

1.3- Les glucosamines

La glucosamine (GlcN) et son dérivé acétylé, la N-acétylglucosamine (GlcNAc), sont toutes deux synthétisées par l'organisme à partir du glucose. Chez l'humain, la production endogène de GlcN se situe dans un intervalle de 4 à 20 g par jour, soit une moyenne d'environ 12 g/jour (Wells *et al.*, 2003). Dû à la forte concentration de GlcN dans les tissus articulaires, il a été proposé, il y a plus de 30 ans, que des suppléments de GlcN procureraient un soulagement des symptômes reliés à l'OA (D'ambrosio *et al.*, 1981). Les mécanismes par lesquels la GlcN aurait un effet thérapeutique ne sont que très partiellement élucidés.

1.3.1- Absorption et métabolisme de la glucosamine chez l'humain

Trois formes de GlcN sont présentement disponibles comme suppléments alimentaires; le sulfate de glucosamine, la glucosamine-HCl et la GlcNAc. Le sulfate de

glucosamine ou les sels chlorés sont dissociés dans l'estomac et la glucosamine libre est absorbée à 90% dans le petit intestin. La plus grande partie de la GlcN est métabolisée lors de son premier passage dans le foie (Setnikar et Rovati, 2001). Elle est ensuite incorporée par les cellules via les transporteurs protéiques du glucose (GLUT) par un processus facilité par l'insuline (Pouwels *et al.*, 2001). Par contre, il semble que dans plusieurs tissus, la GlcN ait une plus faible affinité pour ces transporteurs que le glucose, et que la concentration de GlcN dans ces cellules serait substantiellement plus faible que dans le plasma. Cette plus faible affinité pourrait découler du fait que la GlcN inhibe le transporteur GLUT-4 limitant ainsi son entrée à l'intérieur des cellules. Toutefois, dans certains tissus, chez les mammifères, l'affinité de la GlcN pour le transporteur GLUT-2 est plus forte que pour le glucose (Uldry *et al.*, 2002). Dans ces tissus, la GlcN est transformée en glycoprotéines plus rapidement que le glucose. Les variations dans l'affinité de la GlcN comparativement à celle du glucose pourraient réguler l'utilisation de la GlcN dans différents tissus (Milewski, 2002).

Il a aussi été proposé que la GlcN de source exogène serait principalement utilisée comme substrat dans la biosynthèse de mucopolysaccharides et de biopolymères dans les os et les articulations, contribuant ainsi à la restauration de cartilage endommagé (Bruyère *et al.*, 2004).

1.3.2- Toxicité de la glucosamine

La prise orale de GlcN à forte dose (5000-15000 mg/kg de masse corporelle) est bien tolérée sans aucune toxicité. L'humain peut tolérer jusqu'à plus de 9,7 g de glucosamine par jour (Setnikar et Rovita, 2001).

Plusieurs études menées entre 1980 et 2004 ont évalué la toxicité de la GlcN basée sur des tests de fonctions hépatiques et rénales, sur les valeurs hématologiques (compte différentiel des globules blancs et rouges, de l'hémoglobine et des plaquettes), sur les paramètres cardio-vasculaires (pouls et pression sanguine) et l'analyse urinaire. Aucune de ces études n'a rapporté d'effets indésirables sur ces paramètres suite à l'administration de glucosamine (Tannis *et al.*, 2004). Plusieurs essais cliniques menés

sur l'OA mentionnent, par contre, des effets secondaires non spécifiques reliés à l'administration de GlcN et d'un placebo. Les symptômes les plus communs rapportés suite à l'administration de GlcN et du placebo sont de légers symptômes gastro-intestinaux (constipation, diarrhée, nausée, dyspésie, gaz excessifs, distension abdominale et crampes), des maux de tête, une éruption cutanée et des démangeaisons. Toutefois, l'incidence de ces effets était plus élevée avec le placebo qu'avec la GlcN. En moyenne, le taux d'effets indésirables engendré par la GlcN était 20% plus faible que celui du placebo (Richy *et al.*, 2003).

1.3.3- Efficacité de la glucosamine

Des études ont été menées afin de vérifier l'efficacité de la GlcN dans le traitement des symptômes reliés à l'OA. Il a été démontré que des individus souffrant d'OA au genou et à la colonne vertébrale ont eu significativement moins de symptômes suite à la prise de GlcN par rapport à un placebo (Richy *et al.*, 2003). Ces résultats ont été confirmés par Reginster *et al.* (2001). Le traitement à la glucosamine entraînerait une augmentation de l'espace articulaire alors que l'effet inverse a été observé avec un placebo (Bruyère *et al.*, 2004).

Contrairement aux NSAID, la GlcN n'est pas un analgésique car elle n'a pas d'effet sur la biosynthèse de prostaglandines (PG) puisqu'elle n'affecte pas les COX (Setnikar *et al.*, 1991). D'autres études ont plutôt comparé la prévalence des effets secondaires de la GlcN et des NSAID. Selon l'Institute of Medicine (2004), la prévalence des effets secondaires chez les patients utilisant la GlcN est de 10% comparativement à 32,5% chez les patients utilisant de l'ibuprofène. La GlcN et les NSAID ont des effets similaires mais la GlcN est substantiellement moins toxique (Anderson *et al.*, 2005).

1.3.4- Effet de la glucosamine sur le métabolisme du glucose

Tannis *et al.* (2004) ont montré que l'administration quotidienne de 1500 mg de sulfate de GlcN sur une période de 12 semaines n'entraînait aucun changement au

niveau du glucose plasmatique rapidement utilisable, au niveau d'insuline et à la tolérance orale au glucose. Des tests cliniques ont montré que l'administration de GlcN n'a pas eu d'effet sur la sensibilité à l'insuline et sur le contrôle de la glycémie de sujets diabétiques, quoique des doutes persistent sur des effets hyperglycémiant de la GlcN pour des diabétiques (Scroggie *et al.*, 2003).

1.3.5- Propriétés immunomodulatrices de la glucosamine

Forchhammer et son équipe (2003) ont démontré des différences entre la GlcN et sa forme acétylée, la GlcNAc, quant à leurs effets immunologiques *in vitro*. En effet, il semble que l'acétylation de la GlcN entraîne la perte de plusieurs propriétés immunologiques. Ainsi, la GlcN, mais non la GlcNAc, inhibe la prolifération des lymphocytes T CD4⁺, des lymphocytes T cytotoxiques allospécifiques et la sécrétion d'INF- γ et d'IL-5 chez les cultures lymphocytaires mixtes (CLM) primaires. Lors de réactions lymphocytaires mixtes secondaires, la GlcN a semblé stimuler la prolifération cellulaire sans toutefois affecter la sécrétion d'INF- γ en plus d'inhiber la sécrétion d'IL-4 et d'IL-5 chez lymphocytes Th2. Des tests sur cellules ont démontré que la GlcN inhibe l'effet stimulant de l'IL-4 et de l'IL-2 ainsi que la cytotoxicité du TNF- α . De plus, la GlcN inhibe fortement le potentiel allostimulateur des cellules dendritiques. Les effets anti-inflammatoires de GlcN pourraient être dus en partie à une inhibition de l'activation du NF- κ B qui est impliqué dans l'activation des gènes codant pour des molécules inflammatoires telles que la synthétase inductible de l'oxide nitrique (iNOS), l'IL-1 β et le TNF- α (Wallach *et al.*, 2002). Contrairement à la GlcN, la forme acétylée (GlcNAc) ne semble avoir aucun effet immunomodulateur mis à part un léger effet stimulant chez les CLM primaires enrichies d'IL-2 (Forchhammer *et al.*, 2003).

1.4- Structure et fonctions des cytokines

Comme plusieurs substances inflammatoires sont produites durant le développement de l'OA, il est essentiel d'en comprendre la structure et les fonctions les plus importantes.

TNF- α	<ul style="list-style-type: none"> • Co-facteur dans l'activation des lymphocytes T; • Co-induit la production d'IL-2, d'IL-2R (Ranges <i>et al.</i>, 1988); • Active les macrophages à produire de la PGE₂ et les IL-1, -6, -8 et -10 (Zola et Nikoloutsopoulos, 1989).
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> • Contribue à la génération des lymphocytes T cytotoxiques (Okada <i>et al.</i>, 1988); • ↓ la sécrétion d'IL-1 et de TNF-α chez les macrophages (Van Snick, 1990); • ↑ l'activité des cellules NK et la production d'INF-γ par celles-ci (Lewis <i>et al.</i>, 1991).
IL-10	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ la production des IL-1, -6, -8 et -12 chez les macrophages; • ↓ la production de TNF-α chez des macrophages activés par le PEP (Fiorentino <i>et al.</i>, 1991); • ↓ la production de cytokines pro-inflammatoires par les lymphocytes T de type Th1 (Ding et Shevach, 1992).
IL-12	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ la production d'INF-γ, la prolifération et la cytotoxicité des cellules NK et T CD8+ (Gollob <i>et al.</i>, 1995); • Favorise de développement de cellules effectrices de type Th1 (Metzger <i>et al.</i>, 1995); • Induit la production d'INF-γ par toutes les sous-populations de lymphocytes T (Gollob <i>et al.</i>, 1995).
INF- γ	<ul style="list-style-type: none"> • Active les macrophages et ↑ la synthèse et l'expression du CMH II, du récepteur Fc et de molécules d'adhésion (LFA-1) à leur surface (Farrar et Schreiber, 1993); • Effet antiprolifératif sur les lymphocytes Th2; • ↑ l'activité des cellules NK et des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (De Maeyer et De Maeyer-Guignard, 1992);
TGF- β 1	<ul style="list-style-type: none"> • Bloque la prolifération des lymphocytes B (Swihart <i>et al.</i>, 1995); • ↑ de 10 à 20X la production d'IgA (Lebman <i>et al.</i>, 1990); • ↓ la présentation d'antigène et bloque l'activité des cellules NK en présence d'INF-γ (Swihart <i>et al.</i>, 1995).
PGE ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Impliquée dans l'induction de la douleur (Vane <i>et al.</i>, 1994); • ↑ la production d'IL-4, -5 et -10 (Th₂) et inhibe la production d'INF-γ et de l'IL-2 (Th₁) (Harizi <i>et al.</i>, 2001); • Inhibe la production de TNF-α, d'IL-1β, d'IL-8 et d'IL-12 par les macrophages (Hinz <i>et al.</i>, 2000);

Tableau I : Principales activités biologiques de cytokines pro- et anti-inflammatoires.

1.4.1- Le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α

Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire synthétisée sous forme d'un précurseur actif de 26 kDa protéolytiquement clivé par une métalloprotéinase, engendrant une forme soluble composée de trois sous-unités de 17 kDa chacune. Les gènes du TNF- α sont localisés sur le chromosome 6 chez l'humain et 17 chez la souris. Contrairement à la souris, le TNF- α humain n'est pas glycosylé. Le TNF- α est produit par plusieurs types cellulaires dont les macrophages et les lymphocytes T (Spriggs *et al.*, 1988). Le TNF- α utilise deux récepteurs possédant une homologie de 28%. Le récepteur TNFRp55 est un glycoprotéine retrouvée à la surface des lymphocytes T, tandis que le récepteur TNFRp75 est la forme retrouvée à la surface des monocytes (Tartaglia *et al.*, 1991). Le TNF- α partage plusieurs inducteurs avec l'IL-1 incluant l'IL-1 lui-même, le TNF, le GM-CSF, l'INF- γ et le LPS (Feist *et al.*, 1989). D'autres substances ont plutôt un effet inhibiteur sur la production de TNF- α , dont les glucocorticoïdes et les PG qui agissent sur la transcription des gènes du TNF- α en augmentant, entre autre, le taux d'AMPC. Elles augmentent également les taux de certaines interleukines (IL-4, IL-6, IL-10 et IL-13) reconnues pour leurs effets inhibiteurs sur la production de TNF- α . Le TGF- β est également capable de bloquer la synthèse de TNF- α (Seckinger *et al.*, 1990).

1.4.2- L'interleukine-6 (IL-6)

L'IL-6 est une glycoprotéine de 26kDa dont le récepteur est exprimé autant par les cellules lymphoïdes que non-lymphoïdes. Il est présent chez les lymphocytes B activés et les lymphocytes T au repos (Yamasaki *et al.*, 1988). Plusieurs types de cellules ont la capacité de sécréter de l'IL-6, dont les monocytes et les macrophages, les lymphocytes B et T, les chondrocytes et les cellules synoviales (Shirai *et al.*, 1993). La production d'IL-6 est induite par l'IL-1 et le TNF- α/β , notamment chez les monocytes et les macrophages. Le LPS est également un puissant inducteur d'IL-6 chez ces cellules. Les lymphocytes T de type Th0 et Th2, sous l'influence de mitogènes comme la Con A et le TPA, sont d'importants producteurs d'IL-6. Plusieurs cytokines dont les IL-4 et 10 et le TGF- β ont la capacité d'inhiber la production d'IL-6 par les monocytes/macrophages.

Des inhibiteurs des COX peuvent réduire la production d'IL-6 même si les PG n'ont pas cet effet (Martens *et al.*, 1993).

1.4.3- L'interleukine-10 (IL-10)

Les macrophages peuvent aussi sécréter l'IL-10 (Fiorentino *et al.*, 1991). L'IL-10 est un polypeptide de 178 a.a. et son récepteur présente des similitudes avec celui des interférons. Le récepteur est retrouvé principalement à la surface des lymphocytes B et T, des macrophages et des cellules NK (Carson *et al.*, 1995). L'IL-10 est synthétisée par les lymphocytes Th2 chez la souris et les lymphocytes Th1 et Th2 chez l'humain (Del Prete *et al.*, 1993). Le LPS est un important inducteur d'IL-10 chez les macrophages (Hessle *et al.*, 2000). L'IL-11 stimule la production d'IL-10 par les cellules T CD4+ (Bozza *et al.*, 2001) alors que les glucocorticoïdes la stimulent chez les CD8+ (Richards *et al.*, 2000). D'autres molécules ont plutôt une action inhibitrice sur la production d'IL-10. C'est le cas de l'IL-12 et du NO qui inhibent la synthèse d'IL-10 par les lymphocytes T CD4+ (Bauer *et al.*, 1997).

1.4.4- L'interleukine-12 (IL-12)

L'IL-12 est un hétérodimère de 70 kDa composé de deux glycoprotéines, la gp 40 (40 kDa) et la gp35 (35 kDa) reliées entre elles par un pont disulfure. Le récepteur à l'IL-12 est exprimé à la surface des lymphocytes T CD4+ et CD8+ et des cellules NK activées (Wolf *et al.*, 1994). Les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques sont les principales cellules productrices d'IL-12. Celles-ci produisent de l'IL-12 en réponse à de nombreux agents infectieux (parasites, virus, bactéries) ou leurs toxines induisant ainsi une réponse de type Th1 (Shu *et al.*, 1995). L'INF- γ principalement et le GM-CSF secondairement, induisent la production d'IL-12 chez les monocytes. Toutefois, l'IL-10 inhibe cette production chez ces mêmes cellules. Fait intéressant, les cellules stimulées à produire l'IL-12 produisent de l'IL-10 de manière retardée. En retour, l'IL-10 assure l'inhibition de la production d'IL-12. Le TGF- β et la PGE₂ produits par les phagocytes en réponse à certains agents infectieux inhibent aussi la production d'IL-12 (Kraan *et al.*, 1995).

1.4.5- L'interféron-gamma (INF- γ)

L'INF- γ est un homodimère glycosylé de 45 kDa constitué de 166 a.a. La plupart des cellules de l'organisme possèdent des récepteurs à l'INF- γ , ce qui montre une absence de spécificité tissulaire (Aguet *et al.*, 1988). Les cellules productrices d'INF- γ sont essentiellement les lymphocytes T (CD4+ Th1 et CD8+) et les cellules NK et leur production dépend d'une stimulation par des antigènes, des mitogènes ou des cytokines. La synthèse d'INF- γ par les lymphocytes T et les cellules NK découle de l'activation de ces derniers par différents inducteurs : antigènes, superantigènes, mitogènes, cytokines et composés chimiques. Les lymphocytes Th1 et CD8+ peuvent également produire de l'INF- γ suite à leur stimulation par des mitogènes (PHA, Con A), des extraits bactériens (entérotoxines, produits du mycoplasme), des esters de phorbol ou encore des cytokines (les IL-2, -12, -18 et l'INF- γ) (Young et Hardy, 1990). Les IL-4 et 10 peuvent bloquer la libération d'INF- γ (De Maeyer et De Maeyer-Guignard, 1992).

1.4.6-Le facteur de croissance β 1 des cellules transformées (TGF- β 1)

Le TGF- β est une petite protéine de 25 kDa présente sous trois isoformes chez l'humain (TGF- β 1, 2 et 3). D'autres isoformes, le TGF- β 4 et 5 sont retrouvés chez le poulet (Halper *et al.*, 2004). Trois types de récepteurs (I, II et III) présentent une affinité pour les TGF- β . Ceux-ci se retrouvent à la surface de la quasi-totalité des cellules (Càrcamo *et al.*, 1995). La majorité des cellules de mammifères en culture expriment les ARNm des TGF- β 1, β 2 et β 3, et sécrètent les protéines correspondantes sous forme latente (Miyazono *et al.*, 1993). Les lymphocytes B activés sécrètent du TGF- β 1 essentiellement sous forme latente (Lebman *et al.*, 1990). La transcription du TGF- β 1 est induite par l'ester de phorbol et par le TGF lui-même. Les inducteurs du TGF- β sont des substances ou des conditions de culture qui peuvent activer les formes latentes des TGF- β . Ainsi, la plasmine, la thrombospondine et la sialidas, pour n'en nommer que quelques uns, activent les TGF- β à différents degrés (Miyazono *et al.*, 1993).

1.4.7- La prostaglandine-E₂ (PGE₂)

Les PG sont de petites molécules lipidiques générées par l'action des enzymes COX-1 et 2 sur l'acide arachidonique provenant des phospholipides membranaires (Goetzl *et al.*, 1995). La PGE₂ est la mieux connue de toutes. Elle possède 4 récepteurs différents, EP₁ à EP₄, et exerce son action en se liant à un ou plusieurs de ces récepteurs à la fois. La PGE₂ est produite par une grande variété de cellules incluant les macrophages et les adipocytes (Breyer *et al.*, 2001). Certaines cellules sensibles aux effets de la PGE₂, comme les macrophages, peuvent augmenter directement son expression de façon autocrine en régulant à la hausse l'expression de la COX-2. L'expression de PGE synthétase peut être induite par des stimuli pro-inflammatoires. Ainsi, la PGE₂ est produite en grande quantité par les macrophages en réponse à l'IL-1 et au LPS (Hinz *et al.*, 2000).

1.5- Rôles des macrophages, des lymphocytes et des adipocytes dans la réponse inflammatoire.

1.5.1- Les macrophages

Les macrophages constituent la première ligne de défense de l'immunité innée et sont essentiels au processus inflammatoire (Adams et Hamilton, 1984). Les fonctions des macrophages incluent la phagocytose, la destruction de cellules bactériennes et tumorales (Qureshi et Miller, 1991) et la sécrétion de PGE₂ et de cytokines qui régulent l'activité des lymphocytes et des macrophages (Bonney et Davies, 1984). Le rôle le plus important des macrophages est au sein de la réponse immunitaire. Les cytokines libérées par les macrophages amplifient à la fois les réponses immunes humorale et cellulaire (Jedynak et Siemiatkowski, 2002). De plus, ces cellules traitent les antigènes et présentent leurs fragments aux lymphocytes T par l'intermédiaire des molécules de CMH de class I et II (Unanue et Allen, 1987).

1.5.1.1- Activation des macrophages par le LPS et le PEP

Le lipopolysaccharide (LPS) est une endotoxine bactérienne composée d'un polysaccharide hydrophile et d'un domaine hydrophobe appelé lipide A. Le LPS est un constituant important de la membrane externe des bactéries à Gram négatif et est un des principaux inducteurs microbiens de l'inflammation. Le LPS, par l'intermédiaire du NF- κ B et la protéine activatrice (PA)-1 (Guha et Mackman, 2001), active les monocytes/macrophages à produire des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12 et l'IL-18) ainsi qu'une grande variété d'autres médiateurs incluant des facteurs activateurs de plaquettes (PAF), des PG, des enzymes et des radicaux libres tel que le NO (Cohen, 2002). La production de ces molécules inflammatoires par les monocytes/macrophages contribue au contrôle efficace de la croissance et de la dissémination des pathogènes envahisseurs. Toutefois, une production excessive et non-contrôlée de celles-ci peut entraîner d'importantes complications systémiques telles qu'une dysfonction micro-circulatoire, des dommages tissulaires et une forte mortalité associée au choc septique (Ulevitch et Tobias, 1995).

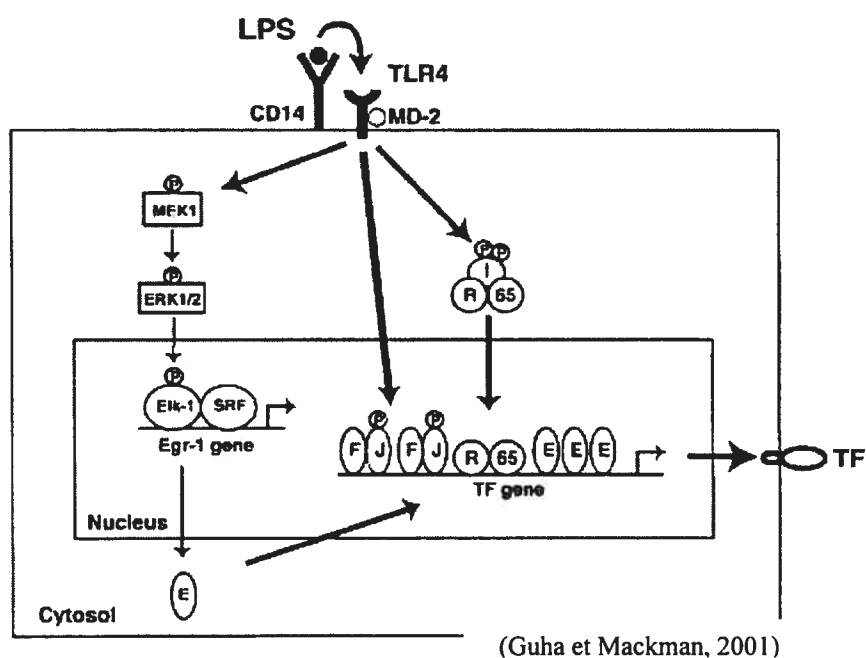


Figure 1 : Induction des gènes de transcription par le LPS chez des monocytes.

Le mécanisme moléculaire d'activation des macrophages par le LPS implique plusieurs kinases comme la protéine kinase A, la protéine kinase C, des kinases associées au Src et les 3 classes de protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK) : les kinases régulées par des signaux extracellulaires (ERK) 1 et 2, la p38 et les kinases c-Jun N-terminal (JNK) (Hambleton *et al.*, 1996). Les protéines G sont également impliquées dans la transduction du signal LPS (Jakway et DeFranco, 1986). Le LPS est reconnu par un complexe formé de trois protéines : CD14, TLR-4 et MD-2. Le CD14 est une glycoprotéine de 55 kDa présente dans le circulation sous forme soluble ou à la surface des cellules de lignée myéloïde. Le LPS endobactérien se fixe dans un premier temps à une protéine du sérum liant le LPS (LBP) qui en retour transfère le monomère de LPS au CD14 présent à la surface du macrophage. Le CD14 concentre le LPS et le présente au complexe récepteur Toll (TLR)-4/MD-2 (Shimazu *et al.*, 1999). La présentation du LPS au TLR-4/MD-2 par le CD14 active les voies de signalisation intracellulaires menant à la production de cytokines et d'autres médiateurs inflammatoires (Guha et Mackman, 2001).

Le peptidoglycan (PEP) est un important composant bactérien qui confère structure et rigidité à la paroi cellulaire. Bien que le PEP soit présent chez toutes les bactéries, on le retrouve en plus grande quantité chez les bactéries Gram positives. Le PEP est connu pour induire une réponse inflammatoire. Cette activité pro-inflammatoire a été mise en évidence par l'injection intrapéritonéal de PEP chez des rats, menant à l'apparition d'arthrite. De plus, des études *in vitro* ont montré que le PEP induisait la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α , l'IL-1 α/β et l'IL-6, chez les monocytes/macrophages, les neutrophiles et les cellules épithéliales (Johannsen, 1993).

Bien que le TLR-2 a été identifié comme l'une des principales molécules impliquées dans l'activation par le PEP, Travassos *et al.* (2004) ont montré que le TLR-2 n'est pas activé par le PEP mais plutôt par les lipoprotéines et l'acide lipotéichoïque présents dans les préparations commerciales de PEP. Ainsi, le PEP serait reconnu par les protéines de reconnaissance du PEP (PGRN) et les protéines Nod (Nod-1, Nod-2 et la cryopyrine). Chez l'humain, quatre familles de PGRN ont été identifiées, soit les

PGRN-S, présentes chez les cellules polymorphonucléées, les PGRN-L localisées dans le foie, et les PGRN-I α et I β présentes dans l'œsophage. L'activation des PGRN et des protéines Nod par le PEP activent le NF- κ B et la p38MAPK menant à la production de cytokines inflammatoires (McDonald *et al.*, 2005).

1.5.2- Les lymphocytes T

Les lymphocytes T peuvent être regroupés en 2 classes, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Les lymphocytes T CD4⁺, également appelés lymphocytes T « helper », peuvent se différencier, en réponse à un signal d'activation, en lymphocytes Th1 ou Th2 présentant des profils différents de production de cytokines. Les différences au niveau des cytokines produites par ces cellules sont également le résultat de leurs fonctions cellulaires (Coffman *et al.*, 1988). Ainsi, les lymphocytes Th1 mènent à une réponse cellulaire et produisent de l'IL-2, de l'INF- γ et du TNF- β tandis que les lymphocytes Th2 entraînent plutôt une réponse principalement humorale par la production des IL-4, -5, -6 et -13. La production de l'IL-3, du TNF- α et du GM-CSF est présente aussi bien chez les lymphocytes Th1 que Th2. De plus, les voies Th1 et Th2 sont antagonistes et s'inhibent mutuellement. Ainsi, l'INF- γ produit par les cellules Th1 amplifie le développement des lymphocytes CD4⁺ Th1 et inhibe la prolifération des CD4⁺ Th2 alors que l'IL-10 produit par les Th2 bloque l'activation des lymphocytes Th1 (Fiorentino *et al.*, 1989). Bien que l'IL-10 est à l'origine décrite comme une cytokine produite par les lymphocytes Th2, il est maintenant clair que l'IL-10 est également sécrétée par les lymphocytes de type Th1 (surtout chez l'humain) et par les macrophages activés (Sornasse *et al.*, 1996).

Les lymphocytes T CD8⁺ se différencient en cellules cytotoxiques par l'activation directes des cellules dendritiques ou par son antigène spécifique en présence de lymphocytes T CD4⁺ (Andreasen *et al.*, 2000). L'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ est assurée par des granzymes capables d'induire l'apoptose chez tous les types cellulaires ciblés et par les perforines permettant le passage des granzymes à travers la membrane. Les lymphocytes T cytotoxiques peuvent également induire l'apoptose des cellules cibles pas la voie Fas (Medana *et al.*, 2000).

1.5.3- Les adipocytes

Le tissu adipeux joue un rôle important dans la réponse inflammatoire. En tant qu'organe sécréteur actif, il envoie et répond à différents signaux qui modulent l'inflammation et l'immunité (Fantuzzi, 2005). Il existe deux types de tissu adipeux ; le tissu adipeux blanc (WAT) qui représente la majorité du tissu adipeux dans l'organisme et qui est le site d'entreposage des réserves énergétiques, et le tissu adipeux brun impliqué dans la thermogénèse. Le WAT, composé en majeure partie d'adipocytes, contient plusieurs autres types cellulaires compris dans la fraction stromavasculaire. Parmi celles-ci, 10% ont été identifiées comme des macrophages CD14⁺CD31⁺ (Curat *et al.*, 2004).

1.5.3.1- Production de cytokines inflammatoires par les adipocytes

Le TNF- α et l'IL-6 sont les deux cytokines les plus étudiées dans l'obésité. Les niveaux circulants de TNF- α et d'IL-6 sont directement corrélés avec l'adiposité et la résistance à l'insuline. Le WAT contribue à environ 30% de l'IL-6 retrouvé en circulation (Fain *et al.*, 2004) et les macrophages contribuent à environ 50% de l'IL-6 dérivée du WAT (Weisberg *et al.*, 2003). L'expression de TNF- α est augmentée dans le tissu adipeux de sujets obèses. Le TNF- α peut entraîner une résistance à l'insuline en inhibant la signalisation de l'insuline. Ainsi, le TNF- α est considéré comme un médiateur de la résistance à l'insuline et possiblement du diabète de type II associé à une adiposité viscérale élevée (Ofei *et al.*, 1996). En plus du TNF- α et de l'IL-6, le tissu adipeux produit une variété d'autres cytokines (IL-1 et IL-18) et de chimiokines (IL-8, MCP-1, MIP-1) (Juge-Aubry *et al.*, 2003).

1.5.3.2- La leptine

La leptine est une protéine non glycosylée de 16 kDa codée par le gène *ob* situé sur le chromosome 7 chez l'homme et 6 chez la souris. Aussi bien chez l'humain que chez la souris, des mutations dans le gène *ob* sont associées à l'obésité et l'hyperphagie. La leptine est considérée de façon classique comme une hormone car elle est à l'origine de l'équilibre entre la prise alimentaire et les dépenses énergétiques, indiquant au

cerveau les changements dans les réserves énergétiques. Synthétisée principalement pas le tissu adipeux (adipocytes), la leptine est également sécrétée en faible quantité par la muqueuse gastrique, le placenta, l'épithélium mammaire et les muscles squelettiques (Friedman et Halaas, 1998).

La leptine est également considérée comme une cytokine et présente des ressemblances structurales avec les cytokines de type I, telles que l'IL-3, l'IL-11, l'IL-12 et le G-CSF (Zhang *et al.*, 1997). En tant que cytokine, la leptine joue un rôle important dans l'immunité via une action directe sur des cellules-clés du système immunitaire. En effet, la leptine agit notamment au niveau des lymphocytes T. Elle les protège contre l'apoptose, augmente la prolifération des cellules T CD4⁺ naïves et diminue la prolifération des lymphocytes T mémoires. La leptine module également la production de cytokines par les lymphocytes T, favorisant une réponse de type Th1 (Loffreda *et al.*, 1998). Finalement, la leptine augmente l'expression des marqueurs d'activation CD25 et CD71 chez les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Farooqi *et al.*, 2002). Chez les monocytes, la leptine augmente l'expression de marqueurs d'activation et régule à la hausse la phagocytose et la production de cytokines telles que l'IL-1 et le TNF- α (Loffreda *et al.*, 1998). La leptine agit aussi au niveau des cellules endothéliales en induisant un stress oxydatif et en régulant à la hausse les molécules d'adhésion. Toutefois, il est à noter que l'activité modulatrice de la leptine dans la réponse inflammatoire et l'immunité n'est observée qu'en présence de co-stimuli (Fantuzzi et Faggioni, 2000).

Une diminution des niveaux de leptine a d'importants effets sur le système immunitaire. En effet, une baisse rapide des niveaux de leptine bloque le fonctionnement optimal des cellules T CD4⁺ (Howard *et al.*, 1999). D'autres études ont démontré que la production de cytokines par les lymphocytes T est supprimée chez des enfants déficients en leptine mais que cette production est restaurée par l'administration de leptine (Farooqi *et al.*, 2002). Une déficience chronique en leptine entraîne une diminution de la sécrétion de cytokines inflammatoires telles que l'IL-2, l'INF- γ , l'IL-18 et le TNF- α lors d'une stimulation antigénique et augmente la production d'IL-4 par les lymphocytes T CD4⁺ (Faggioni *et al.*, 2000). Inversement, l'augmentation de la sécrétion de leptine a

été associée à plusieurs modèles expérimentaux de pathologies inflammatoires dont l'arthrite induite par la carragénine (Gualillo *et al.*, 2000). Chez l'humain, une augmentation de la concentration en leptine a été rapportée dans certaines conditions inflammatoires comme la septicémie, l'endométriose pelvienne et l'inflammation pulmonaire chronique (Landman *et al.*, 2003).

1.6- Voies de signalisation intracellulaire

1.6.1- Le facteur nucléaire- κ B (NF- κ B)

Le NF- κ B est un facteur de transcription dimérique formé de l'hétéro ou de l'homodimérisation des protéines de la famille Rel, telles que la p50 et la p60. L'activation des protéines du NF- κ B joue un rôle central dans la réponse inflammatoire en régulant les gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires, des molécules d'adhésion, des chimiokines, des facteurs de croissance, et des enzymes inductibles telles que la COX-2 et l'iNOS (Baldwin, 1996). Cette voie de signalisation est activée par des stimuli extracellulaires, tels que des cytokines pro-inflammatoires (le TNF et l'IL-1) et des composants bactériens comme le LPS via les récepteurs Toll (TLR) (Nomura, 2001). Le NF- κ B, localisé dans le cytoplasme, forme un complexe avec l'inhibiteur I κ B. L'activation par les stimuli extracellulaires entraîne l'activation du complexe enzymatique IKK qui, par la phosphorylation d'I κ B, libère le dimère de NF- κ B qui se déplace alors dans le noyau où il interagit avec les gènes ciblés (Delhase *et al.*, 1999).

1.6.1.1- Rôles du NF- κ B dans la modulation de la réponse inflammatoire.

La production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (le TNF- α , l'IL-1, l'IL-12, l'IL-6 et l'INF- γ) passe par l'activation de la voie NF- κ B. Le contrôle du NF- κ B pourrait être efficace dans le traitement des maladies inflammatoires. Lawrence *et al.* (2001) ont montré que l'inhibition du NF- κ B diminue l'expression de plusieurs marqueurs pro-inflammatoires incluant des molécules d'adhésion telles que la sélectine E, ICAM-1, VCAM-1 et l'IL-8 chez les cellules endothéliales. Chez les leucocytes, le NF- κ B

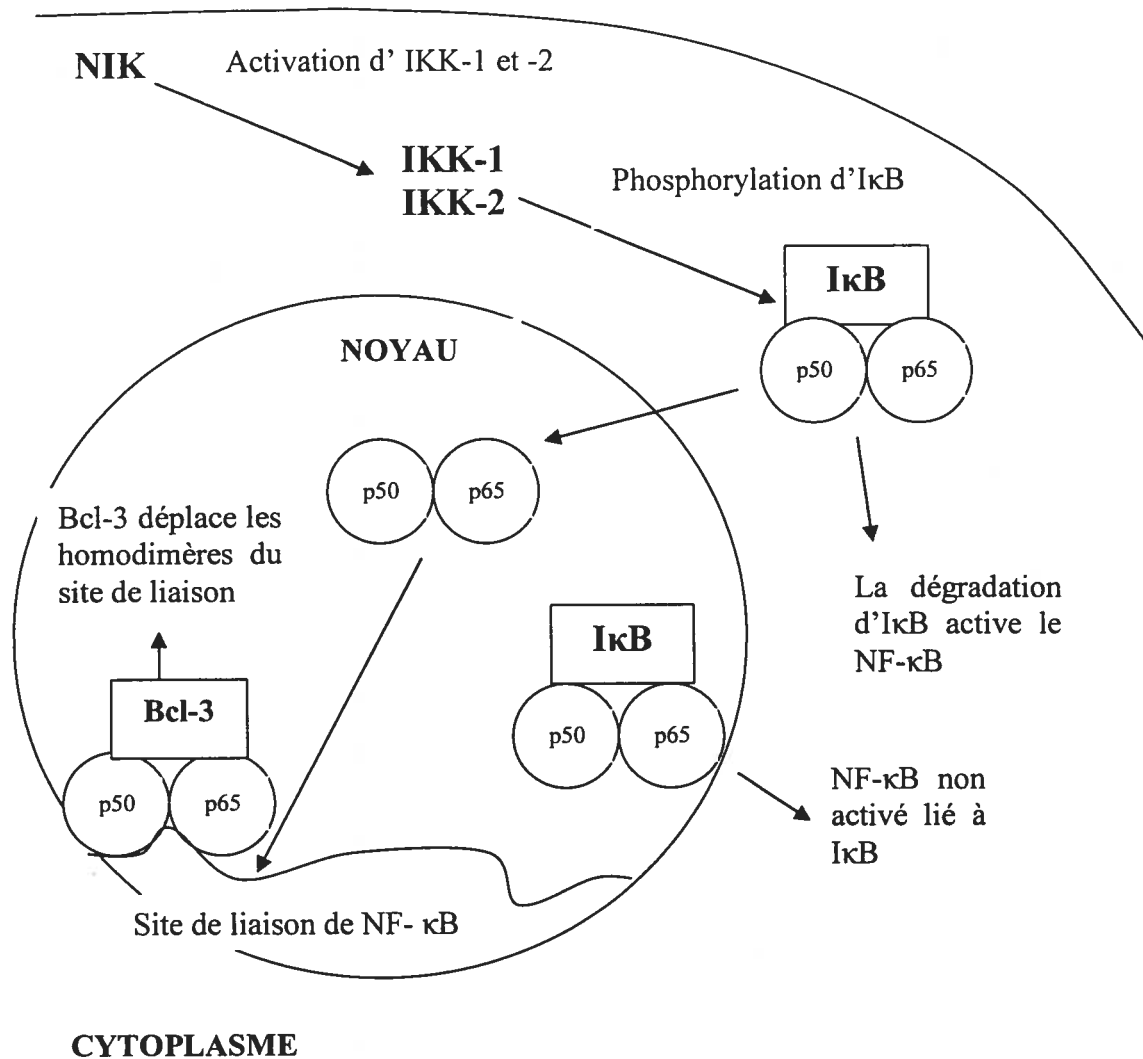


Figure 2 : Mécanisme d'activation du NF-κB. NIK : kinase d'activation du NF-κB, IκB : Inhibiteur de NF-κB. (Inspiré de Nomura, 2001).

favorise l'adhésion et la transmigration des cellules en augmentant l'expression des molécules d'adhésion (Chen *et al.*, 1995). Toutefois, le NF-κB est également impliqué dans la résorption de la réponse inflammatoire. Ainsi, alors que l'activation du NF-κB chez les leucocytes est associée à l'expression de cytokines pro-inflammatoires, elle entraîne plutôt une expression de cytokines anti-inflammatoires à la fin de la réponse (Lawrence *et al.*, 2001).

1.6.1.2- Régulation du NF- κ B et implications pour l'issue de la réponse immunitaire.

Plusieurs molécules, incluant les cytokines elles-mêmes, ont la capacité de moduler la production de cytokines en activant ou en inhibant le NF- κ B. L'inhibition du NF- κ B peut modifier de façon radicale le type de réponse immunitaire. Ainsi, Wilson *et al.* (2005) ont montré que l'inhibition du NF- κ B chez les macrophages rend ces cellules profondément anti-inflammatoires et, suite à leur activation par le LPS, elles voient leur production d'IL-12, de TNF- α et de NO diminuée alors que la production d'IL-10 est plutôt augmentée. Dans plusieurs cas, l'inhibition de la production d'IL-12 est causée en partie par l'IL-10 qui inhibe le NF- κ B (Rahim *et al.*, 2005). L'inhibition du NF- κ B par l'adiponectine induit également une baisse de la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-6, tout en augmentant celle d'IL-10, chez des macrophages activés par le LPS (Wulster-Radcliffe *et al.*, 2004). Bien que le LPS entraîne une forte activation du NF- κ B en induisant la dissociation protéolytique d'I κ B (Ward *et al.*, 2005), l'adiponectine empêche l'induction de la production des cytokines inflammatoires en inhibant la translocation des protéines du NF- κ B dans le noyau (Wulster-Radcliffe *et al.*, 2004). L'inhibition de l'activation du NF- κ B induite par l'IL-1 et par la glucosamine, menant à l'inhibition de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires comme la COX-2, jouerait un rôle important dans le traitement de l'arthrite par la glucosamine (Largo *et al.*, 2003).

1.6.2- Les protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK)

Les MAP Kinases sont d'importants médiateurs qui transmettent des signaux extracellulaires de la membrane au noyau (Treisman, 1996). Trois sous-familles de MAPK ont été identifiées chez les cellules de mammifères; les p42/p44 MAPK (aussi appelé ERK-1 et 2), les kinases c-Jun N-terminale (p46/54JNK), et les p38MAPK. Les sous-familles des MAPK sont activées en réponse à différents stimuli extracellulaires et ont, par conséquent, des fonctions différentes. Les p38MAPK sont fortement activés par des signaux de stress cellulaires tels que des cytokines pro-inflammatoires (le TNF et l'IL-1) et les protéines de choc thermique. Toutefois, l'activation des p38MAPK n'est

pas limitée aux stress cellulaires. Elles peuvent être potentiellement activées par des cytokines hémopoïétiques (Robinson et Cobb, 1997).

1.6.2.1- Rôles de la p38 dans la production de cytokines anti-inflammatoires.

La voie des p38MAPK est reconnue pour favoriser la réponse immunitaire de type Th2. Ainsi, la p38 entraîne l'expression de l'IL-10 et des cytokines de types Th2, les IL-4, -5 et -13, chez les lymphocytes T naïfs et T mémoires. L'induction de la production d'IL-4 par la p38 démontre son rôle dans la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes de type Th2 (Dodeller *et al.*, 2005). Plusieurs substances ont la capacité de moduler la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires en agissant au niveau de la p38. Ainsi, Zhang *et al.* (2005) ont montré que l'hémagglutinine B (Hag B) active, chez les macrophages, la voie des p38MAPK entraînant l'inhibition de la production d'IL-12 et d'INF- γ et l'induction de la production d'IL-10. Similairement, l'inhibition de la p38 chez les macrophages résulte en une augmentation de la production d'IL-12 via l'inhibition de l'IL-10. Ceci confirme que la production d'IL-10 est fortement dépendante de la p38 (Maloney *et al.*, 2005). Un métabolite du leflunomide utilisé comme traitement dans l'arthrite rhumatoïde, le A771726, augmente la production d'IL-10 en activant la p38 (Vergne-Salle *et al.*, 2005). Ceci confirme donc le rôle des p38MAPK dans la réponse immunitaire de type Th2.

1.7- Immunité aviaire

Le système immunitaire aviaire fut grandement utilisé dans l'élaboration des concepts de base en immunologie. Les oiseaux et les mammifères possèdent des voies immunologiques communes mais il existe toutefois plusieurs différences. En effet, le système immunitaire du poulet peut être considéré comme un version simplifiée de celui des mammifères. Entre autre, le poulet ne possède pas d'éosinophiles fonctionnels (Vegad et Katiyar, 1995) et a un répertoire réduit de cellules polymorphonucléées (neutrophiles, éosinophiles et basophiles). Ces cellules sont remplacées par un seul type de cellules, les hétérophiles, prédominants dans la réponse inflammatoire innée des

oiseaux. Le poulet est également déficient en ganglions lymphatiques, site premier de la présentation d'antigènes chez les mammifères (Ruddle, 1999). Ces différences laissent croire que le poulet produit un nombre réduit de cytokines et de chimiokines. Toutefois, le poulet possède des tissus lymphoïdes spécialisés ainsi que des voies de développement lymphocytaire absentes chez les mammifères, notamment la bourse de Fabricius. Le compartiment des lymphocytes T est régulé par des cytokines propres au poulet (Arstila et Lassila, 1993).

1.7.1- Les maladies mucosales des jeunes poulets

L'industrie mondiale de la volaille fournit une proportion substantielle des besoins nutritionnels pour la population humaine en tant que source de protéines retrouvées dans la viande et les œufs. L'industrie de la volaille aux États-Unis comptait plus de 8 milliards de poulets en 1999, dont 3 milliards destinées aux rôtisseries seulement. Chaque année, près de 300 millions de poules pondeuses sont élevées, produisant annuellement environ 65 milliards d'œufs. Dans son ensemble, la production de volaille augmente en moyenne de 2 à 4% par année et il est prévu que cette tendance devrait se maintenir pour encore plusieurs décennies. Dans certains pays en voie de développement, la consommation de viande de volaille est en hausse de 40% depuis 1992. Afin de maintenir le rythme avec la demande grandissante, des pratiques d'élevage intensif ont été développées au cours des dernières années. Ainsi, les poulets sont maintenant entassés, bien souvent dans des conditions difficiles, et des lignées génétiques ont été sélectionnées pour une croissance plus rapide, un rapport protéine/gras corporel plus élevé et des rendements supérieurs de ponte. Une conséquence très négative de ces pratiques est l'augmentation de l'incidence des maladies aviaires. Les infections entériques des jeunes poussins en particulier sont apparues comme un problème majeur menaçant la viabilité de l'industrie de la volaille (Lillehoj *et al.*, 2002).

1.7.1.1- La coccidiose

La coccidiose est causée par un parasite protozoaire intracellulaire appartenant à plusieurs espèces d'*Eimeria*. La cible première de coccidia est l'épithélium intestinal et,

par conséquent, les tissus lymphoïdes associés au système digestif (GALT) servent de première ligne de défense immunitaire pour contrer la colonisation de ce pathogène. De manière générale, le GALT remplit trois fonctions dans la défense de l'hôte contre des pathogènes entériques tels que *Eimeria* : la présentation d'antigènes, la production d'anticorps intestinaux, principalement des IgA et l'activation de l'immunité cellulaire. (Yun *et al.*, 2000). Plusieurs études ont montré des variations dans les sous-populations de lymphocytes T, particulièrement la population TCR $\gamma\delta$ +CD8+, au niveau du GALT chez des poulets résistants ou moins résistants aux infections causées par *E. acervulina* (Lillehoj, 1994). D'autre part, Bessay *et al.* (1996) ont démontré que les proportions de cellules intestinales CD4+, CD8+ et TCR $\gamma\delta$ dans le duodénum étaient significativement augmentées chez des poulets infectés par *E. acervulina* comparativement aux contrôles non-infectés. Vervelde and Jeurissen (1995) ont trouvé que les lymphocytes TCR $\alpha\beta$ +CD4+ sont les cellules prédominantes suite à une infection primaire avec *E. tenella*, alors que, suite à une infection secondaire, un mélange de cellules TCR $\alpha\beta$ +CD4+ et TCR $\gamma\delta$ +CD4+ a été observé. La production de cytokines de type Th1, i.e. favorisant la réponse cellulaire, a été détectée chez les lymphocytes (INF- γ) et les macrophages (TNF- α) du GALT lors d'infections avec *E. acervulina* (Choi *et al.*, 1999). Ces résultats montrent l'importance des mécanismes immunitaires cellulaires dans la réponse de l'hôte à la coccidiose.

1.7.1.2- La salmonellose

Les salmonelles sont des bactéries Gram négatives, aérobiques, non-encapsulées et non-sporulantes qui infectent les mammifères, les oiseaux et les amphibiens. En plus d'entraîner une mortalité et une morbidité chez les volailles, *Salmonella* se transmet de la volaille à l'humain. Ainsi, environ 4 % de la population des États-Unis souffrent d'au moins un cas d'empoisonnement alimentaire chaque année, engendrant des coûts de près de 6 milliards de dollars. La salmonellose est responsable de près de la moitié de ces cas et cause la mort d'environ 2000 personnes chaque année (Bubzy et Roberts, 1996). Les volailles domestiques constituent le plus large réservoir d'infection par la salmonelle pour l'homme. *Salmonella enteritidis* se retrouve sur les coquilles d'œufs suite à un contact avec des surfaces contaminées, ainsi qu'à l'intérieur des œufs de poules

pondeuses infectées au niveau du tractus reproducteur. Jusqu'à 10% des poussins âgés d'un jour sont positifs à *Salmonella* dû à une contamination lors de l'incubation des œufs et au moment de l'éclosion (Labelle et Colin, 1985). Similairement, bien que moins de 10% des poulets entrant dans la chaîne de production alimentaire sont positifs pour la présence de *Salmonella*, 30 à 50% des carcasses deviennent contaminées durant le processus (Waldroup, 1996).

Plusieurs stratégies expérimentales ont été développées dans la réduction de *Salmonella* et seraient applicables aux fermes commerciales, notamment l'utilisation d'antibiotiques ou de suppléments alimentaires chimiques inhibant l'adhésion de *Salmonella* à l'épithélium intestinal, l'exclusion compétitive par des bactéries non pathogènes, la sélection génétique de lignée de poulets afin d'améliorer les réponses immunes et le développement de vaccins (Kaiser *et al.*, 1998).

Le système immunitaire du poulet, en réponse à une stimulation par *Salmonella*, a recours autant à des composantes humorales que cellulaires. L'apparition d'anticorps peu de temps après l'inoculation des bactéries virulentes suggère le rôle important de l'immunité humorale dans la protection contre cette infection (Kaiser *et al.*, 1998). Toutefois, étant donné que les salmonelles sont des pathogènes intracellulaires facultatifs, la protection contre l'infection ne peut être seulement menée par les anticorps et des mécanismes immunitaires cellulaires sont également impliqués. Bien que certaines études aient clairement montré que des mécanismes immunitaires impliquant les lymphocytes T protègent contre les infections expérimentales de *Salmonella*, il n'y a aucun modèle consistant qui montre l'importance de l'immunité cellulaire dans les salmonelloses aviaires (Lessard *et al.*, 1995).

1.7.1.3- La colibacillose

La colibacillose, causée par le pathogène *Escherichia coli* aviaire (APEC), est une maladie aiguë principalement systémique entraînant de lourdes pertes économiques dans l'industrie de la volaille dans le monde. La colibacillose aviaire est un syndrome complexe caractérisé par des lésions à plusieurs organes, dont une aérosacculite et de la

péricardite qui sont associées à une hépatite et péritonite, le plus souvent. Les facteurs environnementaux, la constitution génétique des volailles ou une infection virale initiale influencent l'issue de l'infection par *E. coli*. Les sérotypes considérés comme les plus prévalents sont les O1:K1, O2:K1 et O78:K80, bien que le nombre de sérotypes identifiés ne cesse d'augmenter. De plus, la virulence de l'APEC varie énormément d'un isolat à l'autre alors que la nature moléculaire de cette variabilité n'est pas clairement établie. Les facteurs de virulence connus de l'APEC sont des adhésines (fimbriae P et F1), des systèmes d'acquisition du fer (aérobactine et yersiniabactine), des hémolysines (l'hémolysine E et l'hémagglutinine), une résistance aux effets bactéricides du sérum et à la phagocytose (protéines de la membrane externe) et des toxines et cytotoxines (toxine stable à la chaleur, cyto-vérottoxine). Le tractus respiratoire constitue le principal site d'entrée du *E. coli* aviaire. Les souches d'APEC adhèrent aux cellules épithéliales des sacs aériens via les fimbriae F1. Suite à la colonisation et la multiplication, les bactéries entrent dans la circulation sanguine causant une septicémie responsable de lésions internes multiples majeures des organes et de la mort des oiseaux (Ewers *et al.*, 2003).

1.7.2- Les cytokines aviaires

Le poulet a joué un rôle central dans la découverte des cytokines. Ainsi, le premier interféron (INF) fut décrit comme un facteur soluble interférant avec la croissance du virus de l'influenza A chez des cellules d'œufs embryonnés (Isaacs and Lindenmann, 1957). Contrairement aux mammifères, très peu de cytokines sont identifiées et clonées chez le poulet bien que de nouvelles techniques moléculaires permettent d'en découvrir davantage (Staeheli *et al.*, 2001). Le poulet possède des interférons homologues aux INF- α , INF- β et INF- γ des mammifères. Ils sont étudiés pour leur potentiel comme adjuvants naturels à être incorporés dans des vaccins recombinants (Sharma, 1999). Les macrophages du poulet produisent de l'IL-1 (Qureshi *et al.*, 1994) et du TNF- α (Zuckerman *et al.*, 1989), deux cytokines pro-inflammatoires. Jusqu'à présent, aucune cytokine de type Th2 n'a été identifiée chez le poulet bien que des cytokines à faible caractère Th2 (l'IL-6, l'IL-18 et le TGF- β) aient été clonées (Staeheli *et al.*, 2001).

1.7.3- Les macrophages aviaires

Contrairement aux mammifères, les poulets n'ont que très peu de macrophages péritonéaux. Les autres sources de macrophages sont la moelle osseuse, la bourse de Fabricius, le thymus et la rate, ainsi que les monocytes circulants (Vainio *et al.*, 1983). Chez les mammifères, les macrophages sont reconnus pour être un élément clé dans la régulation de la réponse immune. Malgré un nombre limité d'études chez les lymphocytes de poulet, il a été démontré que les macrophages sont capables de réguler certaines fonctions lymphoïdes. En effet, les macrophages de poulet sont nécessaires à la réponse mitogénique des lymphocytes au mitogène pokeweed (PWM) et à la concanavaleine A (Con A) mais ils peuvent également la supprimer (Schaefer *et al.*, 1985). Les macrophages du poulet expriment à leur surface des récepteurs pour les fragments Fc des Ig et du C3b, ce qui accroît leur capacité à phagocyter des particules opsonisées (Dietert *et al.*, 1991). Tout comme les macrophages des mammifères, les macrophages aviaires sont capables de phagocyter à la fois des particules opsonisées et non-opsonisées, bien que les particules opsonisées soient phagocytées de façon plus efficace (Qureshi *et al.*, 1986). Les macrophages de poulet digèrent les particules phagocytées à l'aide d'enzymes hydrolytiques telles que les lysosomes et la phosphatase acide. Tout comme leurs homologues chez les mammifères, les macrophages aviaires produisent des réactifs intermédiaires oxygénés (ROI) et des réactifs intermédiaires azotés (RNI) (Sung *et al.*, 1991).

Les macrophages de poulet migrent au site d'inflammation en réponse à des facteurs chimiotactiques tels que le fMLP (Golemboski *et al.*, 1990) et possèdent des intégrines reliées aux protéines Mac-1 et LFA (Hynes, 1987).

1.7.4- Les lymphocytes aviaires

1.7.4.1- Lymphocytes B

Alors que la production de lymphocytes B prend place dans la moelle osseuse chez les mammifères, le développement des lymphocytes B a lieu dans la Bourse de Fabricius chez les oiseaux (Glick *et al.*, 1956). De plus, contrairement au modèle mammifère, la

maturation des cellules B chez les oiseaux ne nécessite pas le stade pré-B. Dans l'ensemble, 5% des cellules de la Bourse de Fabricius survivent à la migration vers la périphérie et participent de manière active à la réponse humorale (Sayegh *et al.*, 2000). Les lymphocytes B aviaires ont la même fonction que leurs homologues chez les mammifères, soit la production d'anticorps (réponse humorale). Le répertoire d'anticorps du poulet est généré pendant le stade embryonnaire tardif. Durant la croissance du poussin, les lymphocytes subissent des conversions géniques additionnelles permettant l'expansion du répertoire d'anticorps jusqu'à l'obtention d'un pool mature lorsque la bourse de Fabricius atteint sa pleine maturité vers 5 à 7 semaines d'âge (McCormack et Thompson, 1990).

1.7.4.2- Lymphocytes T

L'initiation de la réponse immunitaire adaptative cellulaire et humorale dépend d'une régulation par les lymphocytes T CD4+, autant chez le poulet que chez l'humain et la souris (Arstila *et al.*, 1994). L'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ décrite chez le poulet semble être similaire à celle des mammifères malgré un nombre limité d'études chez cette espèce (Collisson *et al.*, 2000).

1.7.5- Réponses Th1 et Th2 chez le poulet

L'existence des voies de régulation Th1 et Th2 chez l'oiseau n'a été démontré que récemment. L'absence chez les oiseaux d'allergies associées à la voie Th2, des immunoglobulines E et G du répertoire isotypique des anticorps et le nombre restreint d'éosinophiles, de basophiles et de mastocytes, toutes des cellules impliquées dans la réponse Th2 chez les mammifères, ont longtemps laissé croire que les oiseaux ne possédaient qu'un seul type de réponse cellulaire, soit la réponse Th1. Plus encore, seules des cytokines de type Th1, incluant des analogues aviaires de l'INF- γ (ChINF- γ) et de l'IL-18 (ChIL-18), ont été détectées, alors que l'homologue poulet de l'IL-12 (ChIL-12) vient tout juste d'être identifié (Degen *et al.*, 2004). De plus, ces deux cytokines n'ont en fait que 30 à 35% d'homologie avec celles des mammifères au niveau de leur séquence en acides aminés. L'existence des voies Th1 et Th2 chez le poulet a été

démontrée, en 2005, par Degen et collaborateurs. Leurs travaux ont mis en évidence, dans un premier temps, la réponse immunitaire médiée par des cytokines de type Th1 tel qu'observé chez les mammifères. Pour ce faire, des poulets ont été infectés avec le virus de la maladie de Newcastle (NDV) reconnue pour induire une réponse Th1 chez les mammifères. L'infection virale aiguë chez le poulet a été caractérisée par l'expression élevée de ChINF- γ dans la rate après 24 heures, dans la même veine que les observations de cytokines de type Th1 dans des infections virales chez les mammifères, et ce sans qu'il y ait augmentation des cytokines de type Th2. L'augmentation de l'expression de ChINF- γ dans la rate à 24 heures a été associée à la baisse de l'expression de ChIL-13. Dans un deuxième temps, Degen *et al.* (2005) ont montré la présence d'une voie Th2 chez le poulet équivalente à celle observée chez les mammifères qui se caractérise par l'augmentation des niveaux d'IL-4 et d'IL-13. Ainsi, des poulets ont été exposés à une infestation d'helminthes reconnue pour induire une réponse Th2 chez les mammifères. Les résultats ont montré que les poulets infectés oralement par des œufs embryonnés de *A. galli* présentaient une réponse caractéristique de la production de cytokines Th2 14 jours après l'infection, avec des augmentations sélectives de ChIL-4 et ChIL-13 dans les tissus immunitaires intestinaux et spléniques, accompagnées d'une diminution de ChINF- γ .

1.7.6- Immunité mucoale du poulet

Afin de pouvoir développer des stratégies de contrôle immunologique contre les maladies respiratoires et intestinales, il est crucial de comprendre le système immunitaire intestinale et la réponse immune mucoale. Le poulet, au même titre que le mammifère, possède un système immunitaire mucoal séparé présentant plusieurs caractéristiques uniques. Les tissus lymphoïdes associés au système digestif (GALT) font partie du système immunitaire mucoal (MALT) dont fait également partie les tissus lymphoïdes bronchiaux, salivaires, naso-pharyngiens et génito-urinaires. Le MALT est caractérisé par la présence de cellules présentatrices d'antigènes (CPA), de cellules immunorégulatrices et de cellules effectrices se distinguant de leurs homologues du système immunitaire systémique. L'administration orale d'antigènes étrangers

entraîne l'activation des lymphocytes T helper et des lymphocytes B précurseurs des IgA présents dans le GALT, plus particulièrement au niveau des plaques de Peyer (PP), et leur migration vers les sites mucosaux effecteurs tels que la lamina propria (LP) de l'intestin et vers le tractus respiratoire. De là, ces cellules enclenchent une réponse sécrétrice antigène-spécifique médiée par les IgA. Cette activation des lymphocytes B et T du GALT suivie de leur migration vers des sites effecteurs pour le développement de réponses immunes mucosales fait partie du système immunitaire mucosal (McGhee *et al.*, 1989). Ce système mucosal est constitué de deux compartiments distincts mais interconnectés, soient les sites mucosaux inductifs, incluant les tissus lymphoïdes nasaux (NALT) et GALT, et les sites mucosaux effecteurs dont font partie le LP de l'intestin et le tractus respiratoire supérieur. Ces tissus mucosaux effecteurs sont surtout composés de lymphocytes T, principalement des lymphocytes T CD41 mémoires et des T effecteurs, mais contiennent également une grande quantité de lymphocytes B et de plasmocytes, majoritairement de type IgA. Un des points marquants du système immunitaire mucosal est le transport intraépithélial des IgA polymériques dans les sécrétions externes. Le transport externe d'Ig se fait à partir du sang et des fluides tissulaires vers la muqueuse externe des tractus alimentaire, respiratoire, génito-urinaire et nasolacrimal (Lillehoj et Trout, 1994).

1.7.6.1- Le GALT

Chez le poulet, le GALT comprend des structures lymphoïdes organisées telles que la bourse de Fabricius, les amygdales caecales (AC), les PP, le diverticulum de Meckel et les agrégats de lymphocytes distribués le long de l'épithélium et de la LP intestinal. Les AC sont des nodules lymphoïdes localisés aux extrémités proximales du ceacum près de la jonction iléocolonique (Befus *et al.*, 1980) possédant une structure semblable à celle des PP. Les AC sont composés de lymphocytes B et T dans les centres germinatifs, ainsi que de plasmocytes exprimant à leur surface des IgM, des IgG et des IgA (Glick *et al.*, 1981). Toutefois, le rôle des AC n'a pas encore été déterminé.

Les PP sont des agrégats lymphoïdes situés dans l'intestin possédant un lymphoépithélium morphologiquement distinct composé de cellules M, de follicules, d'une

zone subépithéliale dépendante des lymphocytes B ainsi qu'une zone centrale dépendante des lymphocytes T (Befus *et al.*, 1980). Les PP sont un site majeur pour l'induction de réponses IgA dans le tractus gastrointestinal envers des microorganismes pathogènes et des antigènes ingérés. Chez les mammifères, les PP contiennent environ 40% de lymphocytes B dont un fort pourcentage appartiennent à l'isotype IgA (Kiyono *et al.*, 1985). Les lymphocytes T régulateurs représentent 40% des cellules des PP dont 40 à 50% sont des cellules helper/Lyt-11 et de 15 à 20% sont des cellules suppressives/Lyt-21 cytotoxiques. Un pourcentage significatif des cellules des PP ont à leur surface des récepteurs Fc pour les IgA et jouent un rôle important dans la régulation des réponses médiées par ces Ig. D'autres cellules dites accessoires sont présentes dans les PP. Parmi celles-ci des macrophages (5 à 9%), des cellules dendritiques fonctionnelles et des cellules phagocytaires comme les cellules M (Bokman et Cooper, 1973).

Les AC et les PP peuvent être facilement identifiés chez des poulets 10 jours après l'éclosion (Kiyono *et al.*, 1985). Au cours de leur développement, les agrégats lymphoïdes intestinaux des poussins subissent des modifications de sorte qu'à 20 semaines, les follicules lymphoïdes deviennent de moins en moins distincts et diminuent en nombre alors qu'il semble y avoir une dépopulation des zones subépithéliales dans les AC et les PP. Les PP peuvent être identifiées dans l'intestin dès le premier ou deuxième jour et croissent jusqu'à un maximum de 16 semaines. Par contre, le nombre de PP décroît avec l'âge de telle sorte que chez le poulet adulte, une seule PP persiste à la jonction iléocaecale (Lillehoj et Trout, 1996).

Les leucocytes intestinaux du poulet sont composés de 80% de lymphocytes B, de 10 à 15% de monocytes, d'approximativement 5% de cellules mononucléées autres et de moins de 1% de leucocytes polymorphonucléées et de plasmocytes (Befus *et al.*, 1980). Le LP, pour sa part, est composé à 80% de lymphocytes, 20% de monocytes et moins de 1% de leucocytes polymorphonucléées. Des cellules mononucléées isolées dans l'épithélium et dans le LP se sont avérées être Ig positives, soit 29,5% parmi les lymphocytes de LP et 7,9% des lymphocytes spléniques. Des cellules TCR $\alpha\beta$ se retrouvent dans l'intraépithélium ainsi que dans le LP, alors que les cellules TCR $\gamma\delta$ se retrouvent principalement au niveau de l'épithélium (Lillehoj et Trout, 1996).

1.7.6.2- Fonctions effectrices associées au GALT

Suite à l'infection, les lymphocytes T et B initient une série de réponses antigène spécifique ou non-spécifique impliquant les anticorps, les leucocytes et la production locale de cytokines. Le rôle des différents composants du GALT dans la réponse de l'hôte à des infections microbiennes est bien connu (Brandtzaeg *et al.*, 1987). A la suite d'une exposition à l'agent microbien, d'importants changements architecturaux surviennent dont l'augmentation de la perméabilité, l'infiltration des cellules, l'augmentation de la prolifération des cellules cryptes et la production de mucine, d'enzymes et d'Ig. Les interactions complexes qui s'établissent entre les lymphocytes, les cellules épithéliales, les cellules dendritiques et les macrophages résidents sont impliqués à la fois dans la sécrétion d'Ig et dans la production de mucine alors que le système immunitaire de l'hôte s'affaire à créer un microenvironnement incompatible avec la survie des pathogènes. Les mécanismes immunologiques prenant place sont les mêmes que ceux retrouvés dans le système immunitaire systémique, i.e. la présentation des antigènes de l'agent infectieux et la mise en branle des réponses immunes médiées par les anticorps et des réponses cellulaires (Lillehoj et Trout, 1996).

1.7.7- Pourquoi s'intéresser au modèle aviaire?

Les composants diététiques peuvent sans aucun doute avoir une influence significative sur l'habilité de l'hôte à développer une réponse immunitaire efficace. Une pratique courante dans l'industrie consiste à utiliser des suppléments à des niveaux plus élevés que ce qui est généralement employé. Cette pratique se base sur l'identification de composants ayant le potentiel de renforcer le système immunitaire. Ainsi, lorsqu'administré en excès (30 ppm et plus), les suppléments de zinc dans la diète sous la forme de complexes organiques zinc-méthionine améliorent la phagocytose de *Salmonella enteritidis* par les macrophages chez des jeunes dindes (Kidd *et al.*, 1994). D'autres études ont montré que des suppléments alimentaires composés de substances naturelles telles que *Spirulina platensis*, une algue bleue-verte riche en protéines, en vitamines et en minéraux, augmentent l'élimination d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* de la circulation systémique et de la rate du poulet, suggérant

l'activation du système phagocytaire (Qureshi *et al.*, 1995). Par contre, il n'y a pas encore réellement d'alternatives à l'usage des antibiotiques comme facteurs de croissance afin de stimuler l'immunité de jeunes poulets et de diminuer la prévalence des maladies ou de leur transmission.

1.8- Hypothèses

L'OA est une maladie dégénérative des articulations qui entraîne de la douleur chronique et la perte graduelle de fonction des articulations touchées. Plusieurs produits, tels que des NSAID comme l'ibuprofène, sont utilisés dans le traitement de cette maladie. Toutefois, bien que ces substances aient des effets positifs au niveau entre autre de la diminution de la douleur, il a été clairement démontré que les NSAID ne renversent pas le processus dégénératif de l'OA (Palmski et Brandt, 1980). Il est donc important de se tourner vers d'autres molécules chondroprotectrices et/ou anti-inflammatoires qui ont la capacité de renverser le processus dégénératif associé à cette maladie. La compagnie ISM Biopolymer Inc. a mis au point de nouvelles molécules, le produit OligoviaTM et d'autres dérivés de chitosane, d'après une procédure brevetée. Le chitosane, un polysaccharide composé de résidus de glucosamine, a déjà fait ses preuves comme immunomodulateur mais les effets varient en fonction de la taille et du degré de dé-acétylation de la molécule (Chou *et al.*, 2003). Au cours de ce travail, nous nous proposons de vérifier si les dérivés de chitosane de différents PM produits par ISM Biopolymer Inc. pourraient moduler la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires dans différents modèles animaux.

Il est proposé que les dérivés de chitosane de faible PM pourraient entraîner la production de cytokines suppressives. Afin de démontrer cette première hypothèse, un modèle *in vivo* d'ostéoarthrite expérimental a été utilisé où des souris C57BL/6 ont reçu une injection de carragénine dans l'articulation fémoro-tibiale avant ou après l'administration par voie orale du produit OligoviaTM. L'enflure des tissus ciblés a été suivie et les niveaux de cytokines retrouvées dans les articulations et dans le sang ont été mesurés. Les effets des dérivés de chitosane de faible PM sur la production *in vitro* de cytokines pro- et anti-inflammatoire par les macrophages péritonéaux, les lymphocytes

spléniques et les adipocytes de la région paramétriale de souris C57BL/6 ont été étudiés afin d'identifier le ou les facteurs impliqués dans la modulation de la réponse inflammatoire. De plus, afin de vérifier par quels mécanismes les dérivés de chitosane influencent la réponse inflammatoire, l'activation du NF- κ B et de la p38MAPK ont été vérifiés chez des macrophages péritonéaux de souris C57BL/6.

D'autre part, il est possible que les dérivés de chitosane de haut PM puissent agir comme immunostimulants, lorsqu'administrés par voie orale. Cette hypothèse a été vérifiée dans le modèle aviaire. L'industrie de la volaille est confrontée à des maladies apparaissant chez les jeunes poussins, telle que la colibacillose aviaire, entraînant des pertes économiques importantes. L'immaturation immunologique des lymphocytes est en partie responsable de cette situation. A cause des problèmes de résistance aux antibiotiques, l'ajout de ces produits comme moyen de prévenir des maladies aviaires est maintenant restreint. Or, des composés diététiques naturels pourraient améliorer la réponse immunitaire (Qureshi *et al.*, 1995). Il est proposé, dans ce travail, que les dérivés de chitosane de haut PM seraient immunostimulants pour de jeunes poussins.

Ainsi, pour confirmer cette hypothèse, les propriétés immunostimulantes des dérivés de chitosane de haut PM ont été testées *in vitro* sur des splénocytes de poussins de différents âges et de poulets adultes, et la capacité des différents produits à stimuler l'activité cellulaire, à modifier l'équilibre des différentes populations lymphocytaires et à induire la production de cytokines pro-inflammatoires aviaires a été évaluée.

2- MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1- Souris

Des souris femelles C57BL/6 âgées de 8 à 12 semaines, obtenues de Charles River Laboratories (St-Constant, Qc, Canada), ont été utilisées pour les expériences *in vivo* et *in vitro*. Les animaux ont été gardés en atmosphère stérile dans un animalerie autonome sous des conditions de luminosité 12 heures/12 heures et nourris *ad libitum*. Les souris ont été euthanasiées par inhalation de dioxyde de carbone (CO₂) et les organes ont été prélevés stérilement pour l'isolement cellulaire.

2.2- Poussins SPF

Des œufs embryonnés exempts d'agents pathogènes spécifiques (SPF) ont été fournis par la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal (St-Hyacinthe, Qc, Canada) une semaine avant leur éclosion. Les œufs ont été gardés dans une couveuse à 38-39°C jusqu'à leur éclosion, puis transférés deux jours plus tard dans une éleveuse pour une durée de 7 à 14 jours en fonction des expériences (Animalerie du département des sciences biologiques de l'Université du Québec à Montréal). Les poussins ont été nourris et traités selon les normes du Conseil Canadien de la Protection des Animaux.

2.3- Poulets adultes

Des rates de poulets commerciaux âgées de 35 semaines ont été gracieusement fournies par EXCELDOR (St-Damase, Qc, Canada). Les rates ont été transportées sur de la glace jusqu'au laboratoire.

2.4- Dérivés de chitosane

Les dérivés de chitosane, fournis par ISM Biopolymer Inc. (Granby, Qc, Canada), ont été fabriqués à partir de chitosane selon un procédé de déacétylation et d'hydrolyse breveté. Des produits de faible PM présentés comme les produits A, B, AB, D, W et JF ont été utilisés chez le modèle murin, alors que les produits de haut PM, les produits dits W, E, G, 12R, 18R, X1 et Y1 ont plutôt été utilisés dans le modèle aviaire. Les produits

ont été reconstitués dans du milieu RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, NY) contenant de la L-glutamine (2mM), des antibiotiques (pénicilline (100 U/ml), streptomycine (100 mg/ml), du 2-mercaptoéthanol (10^{-5} M) et 20% de sérum de veau foetal (SVF) (HyClone, Professional Diagnostic, Edmonton, Alberta, Canada). Les solutions ont été stérilisées à l'aide d'un filtre de 0,45 μ m et entreposées à -20°C .

2.5- Prélèvement des organes et isolement cellulaire

2.5.1- Prélèvement des macrophages péritonéaux

Les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 ont été obtenus par lavage péritonéal. Environ 10 ml de milieu RPMI 1640 contenant 20% de SVF a été injecté dans l'abdomen à l'aide d'une seringue de 10 ml et d'une aiguille d'un pouce 18 (Becton-Dickinson, Mississauga, Ont, Canada). Les abdomens des souris ont été délicatement massés durant environ 2 minutes afin de décoller les macrophages adhérents au péritoine. Les exudats cellulaires ont été retirés puis déposés dans des tubes coniques stériles de 15 ml (Sarstedt, Montréal, Qc, Canada) contenant 0,4 ml d'héparine 1000U/ml (Sigma, Oakville, On, Canada). Les tubes ont ensuite été centrifugés 2 fois à 4°C durant 10 minutes à 1300 rpm. Les culots ont été resuspendus dans 5 ml de RPMI contenant 20% de SVF et les cellules ont été ajustées à une concentration de 1×10^6 cellules/ml.

2.5.2- Prélèvement des cellules de la rate

Les splénocytes de souris C57BL/6, de poussins SPF âgés de 7 et 14 jours et de poulets adultes ont été obtenus par dissociation du tissu suite à un frottement sur un treillis de 70 μ m (Becton-Dickinson) dans du milieu RPMI 1640 contenant 20% de SVF. Les cellules spléniques ont ensuite été lavées à l'aide d'une solution de RPMI 1640 contenant 20% de SVF. Les rates de poulets adultes n'ont pas pu être extraites dans des conditions stériles. Afin d'éviter une contamination, les rates ont été plongées dans de l'éthanol 70% durant 3 minutes (VWR International Ltd, Montréal, Qc, Canada), environ 2mm de tissu périphérique a été enlevé, et les cellules ont été isolées du tissu splénique interne.

2.5.3- Prélèvement des adipocytes

Le tissu adipeux de souris C57BL/6 a été prélevé au niveau de la région paramétriale, puis déposé dans des tubes coniques stériles de 50 ml contenant 4 ml de Milieu 199 (GIBCO) contenant 20% de SVF, auquel 1 ml de collagénase 10 mg/ml (Sigma) a été ajouté. Les tubes ont ensuite été incubés 45 minutes au bain-marie agitateur (37 °C, 120 rpm) après quoi, la suspension a été filtrée à travers un filtre de nylon et recueillie dans un tube conique stérile de 50 ml. Suite à l'accumulation des adipocytes à la surface du tube (formation d'une bande blanche constituée des adipocytes), ceux-ci ont été lavés 5 fois puis resuspendus dans 5 ml de Milieu 199 additionné de 20% SVF. La concentration cellulaire a ensuite été ajustée à 500 000 cellules/ml selon l'extraction.

2.5.4- Prélèvement du liquide synovial et du sérum

Le liquide synovial des souris C57BL/6 dans le modèle d'ostéoarthrite expérimental a été récupéré à l'aide de seringue de 1ml puis congelé à -80 °C en attendant le dosage des cytokines.

Le sérum a été isolé à partir du sang récupéré par le sectionnement de l'aorte abdominale chez des souris sous anesthésie. En moyenne 500 µl de sang a été récolté chez chaque individu dans des microtubes. Après la formation du caillot, les tubes ont été centrifugés à 4 °C (13000 rpm durant 1 minute) et les surnageants ont été récoltés et conservés à -80 °C pour le dosage des cytokines.

2.6- Traitement *in vitro* des cellules avec les dérivés de chitosane

2.6.1- Traitement des macrophages avec les dérivés de chitosane

2.6.1.1- Macrophages péritonéaux et dérivés de chitosane de faible PM

Les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 ont été mis en culture (450 000 cellules/puit) dans des plaques 24 puits (Sarstedt) avec les produits A, B, AB, D, W et JF

(50 µl) à des concentrations variant de 1,25 à 160 µg/ml, en absence ou en présence de PEP (10 µg/ml) (Sigma), et en utilisant du LPS et/ou du PEP (10 µg/ml) comme contrôles positifs. Les plaques ont été incubées pendant 24 heures à 37 °C sous une atmosphère contenant 5% de CO₂. Les surnageants ont été recueillis et gardés à -80 °C pour le dosage des cytokines.

2.6.1.2- Macrophages spléniques et dérivés de chitosane de haut PM

Dans le modèle aviaire, les macrophages spléniques ont été préférés aux macrophages péritonéaux à cause de leur plus grand nombre et de leur facilité d'isolement chez les oiseaux. A partir des cellules isolées de la rate, les macrophages ont été enrichis par adhérence dans des plaques 24 puits et incubés pendant 2 heures. Les macrophages ont ensuite été traités, tel que décrit à la section 2.6.1.1, mais avec les oligomères de haut PM soit les produits E, G, 12R, 18R, X1 et Y1 à des concentrations variant de 1,25 à 80 µg/ml en utilisant le LPS et la concanavaline A (50 µg/ml) (Sigma) comme contrôles positifs. Le produit W de plus faible PM a aussi été étudié dans le modèle aviaire.

2.6.2- Traitement des lymphocytes spléniques avec les dérivés de chitosane

Les lymphocytes ont été enrichis à partir de la suspension cellulaire provenant de la rate par passage sur un gradient lymphoprep (Fisher Scientific, Montréal, Qc, Canada) puis centrifugés à 4 °C (2500 rpm durant 20 minutes). Les cellules présentes dans l'anneau à l'interface du gradient ont été récoltées, lavées et centrifugées 10 minutes à 1500 rpm puis resuspendues dans 5 ml de RPMI 1640 contenant 20% de SVF. La concentration de la suspension de lymphocytes a été ajustée à 1×10^6 cellules/ml dans du RPMI 1640 contenant 20% SVF.

2.6.2.1- Modèle murin (souris C57BL/6)

Chez le modèle murin, 180 µl de lymphocytes spléniques de souris C57BL/6 ont été déposés dans des plaques 96 puits (Sarstedt) avec les produits A, B, AB, D, W et JF (20 µl) à des concentrations variant de 1,25 à 160 µg/ml, en absence ou en présence de

LPS (0,5 µg/ml), et en utilisant du LPS et/ou du PEP (10 µg/ml) comme contrôles positifs. Les plaques ont été incubées pendant 20 heures à 37 °C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ pour des tests de transformation blastique.

2.6.2.2- Modèle aviaire (poussins SPF et poulets adultes)

Pour le modèle aviaire, la procédure a été la même excepté que les oligomères utilisés étaient de haut PM (E, G, 12R, 18R, X1, Y1) et le contrôle positif consistait en des cellules traités avec la Con A. Le produit W a aussi été testé. Les cellules, à une concentration de 1×10^6 cellules/puits, ont été incubées dans des plaques 24 puits pour une durée de 48 heures. Des tests de transformation blastique, de production de cytokines et de phénotypage ont été réalisés à partir de ce type de protocole.

2.6.3- Traitement des lymphocytes avec des surnageants de macrophages incubés avec des dérivés de chitosane

2.6.3.1- Modèle murin (souris C57BL/6)

Des lymphocytes spléniques ont été isolés selon le procédé décrit à la section 2.6.2, puis incubés dans des plaques 96 puits (100 000 cellules/puit) avec 100µl de surnageants de macrophages péritonéaux activés ou non par le PEP (10 µg/ml) (Sigma) et traités avec les différents dérivés de chitosane de faible PM (voir la procédure expérimentale à la section 2.6.1.1.). Les plaques, ont été incubées pendant 20 heures à 37 °C et les niveaux de transformation blastique ont été évalués, tel que décrit dans la section 2.9.1.

2.6.3.2- Modèle aviaire (poussins SPF et poulets adultes)

La transformation blastique a également été étudiée chez le poulet et les cellules ont été préparées de la même façon que pour la souris sauf que ce sont des macrophages spléniques qui ont été traités avec les dérivés de chitosane (procédure expérimentale décrite à la section 2.6.1.2.). Les cellules ont été incubées à 39 °C au lieu de 37 °C sous une atmosphère de 5% de CO₂.

2.6.4- Traitement des adipocytes murins avec les dérivés de chitosane

Les adipocytes ont été mis en culture (375 000 à 500 000 cellules/puit) dans des plaques 24 puits avec les produits A, B, AB, D, W et JF (100 µl) à des concentrations variant de 1,25 à 160 µg/ml, et en utilisant du LPS et/ou du PEP comme contrôles positifs. Les plaques ont été incubées pendant 24 heures à 37 °C. Les surnageants recueillis ont été entreposés à -80 °C et les cytokines produites ont été dosées, tel qu'indiqué à la section 2.7.3.

Pour ce qui est du dosage de la leptine, les produits A, B, C et D ont été testés à des concentrations variant de 10 à 160 µg/ml en présence de surnageants de macrophages péritonéaux de souris activés ou non par le PEP (voir la section 2.6.1.1).

2.7- Dosage des cytokines

2.7.1- Les cytokines macrophagiques

Les niveaux de TNF- α , d'IL-12, d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-10, de TGF- β 1 et de PGE₂ produits suite aux traitements avec les dérivés de chitosane ont été évalués dans les surnageants de macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 à l'aide de tests ELISA. Toutes les cytokines ont été mesurées avec des tests commerciaux de BD Pharmingen à l'exception des tests pour le TGF- β 1 (Biosource) et pour la PGE₂ (R&D Systems par Cederlane, Hornby, Ont, Canada) . Les procédures ont été celles indiquées par les manufacturiers.

Les niveaux d'IL-6, d'IL-10 et de la PGE₂ ont été mesurés dans le liquide synovial et le sérum de souris C57BL/6 suite à l'OA expérimentale induite par la carragénine. Ces substances ont été quantifiées à l'aide de tests ELISA.

2.7.2- Les cytokines lymphocytaires

Les niveaux d'INF- γ ont été mesurés dans les surnageants de splénocytes de poussins SPF âgés de 7 et de 14 jours ainsi que chez des cellules de poulets adultes traités avec les dérivés de chitosane. La présence d'INF- γ a été mise en évidence par un

test ELISA (Biosource, Mediacorp, Montréal, Qc, Canada) selon le protocole fourni par le fabricant.

2.7.3- Les adipokines

Les adipokines telles que le TNF- α , l'IL-1- β , l'IL-6, la PGE₂ ainsi que la leptine ont été quantifiées dans les surnageants d'adipocytes provenant de la région paramétriale chez des souris C57BL/6 traités *in vitro* avec les surnageants de macrophages péritonéaux stimulés ou non par le PEP en présence des différents dérivés de chitosane durant 24 heures. Les niveaux de ces substances ont été mesurés à l'aide de tests ELISA selon les protocoles fournis par les fabricants.

2.8- Détermination des voies de signalisation activées par les dérivés de chitosane.

Les niveaux de NF- κ B et de p38 ont été mesurés dans des lysats cellulaires de macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 activés avec du PEP et traités avec les produits A, B, D, et W selon la procédure décrite à la section 2.6.1.1. La lyse des cellules a été effectuée en incubant 5×10^6 cellules dans 500 μ l de tampon de lyse (Biosource) contenant 1 mM de PMSF et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma) pendant 30 minutes à 4 °C tout en vortexant à intervalle de 10 minutes. Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 10 minutes à 13000 rpm et les surnageants ont été récoltés et conservés à -80 °C. Les niveaux de NF- κ B et de p38 ont été mesurés à l'aide de tests ELISA (Biosource) selon les protocoles fournis par les fabricants.

2.9- Prolifération des lymphocytes spléniques en réponse aux dérivés de chitosane.

2.9.1- Modèle murin (souris C57BL/6)

L'effet des dérivés de chitosane sur l'activité métabolique des lymphocytes spléniques de souris C57BL/6 a été évalué par le test de réduction des sels de tétrazolium (MTS-PMS) (Promega, Madison, WI) à partir des cultures de lymphocytes spléniques obtenues selon les procédures décrites aux sections 2.6.2.1. et 2.6.3.1. Les cellules ont ensuite été incubées pour une durée de 72 heures à 37 °C. Après 20 heures

d'incubation, une solution de MTS-PMS (1 :5 dans du milieu RPMI 1640 20% SVF) a été ajoutée (40 µl/puit), puis les densités optiques (D.O.) ont été enregistrées à 24, 48 et 72 heures à une longueur d'onde de 490 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

2.9.2- Modèle aviaire (poussins SPF et poulets adultes)

Les effets des dérivés de chitosane de haut PM ont également été étudiés dans un modèle aviaire. Les cultures de lymphocytes spléniques utilisées ont été obtenues suivant les procédures décrites dans les sections 2.6.2.2 et 2.6.3.2. Les cellules ont été incubées à 39 °C et l'activité métabolique des lymphocytes a été évaluée, telle que mentionnée à la section 2.8.1.

2.10- Doubles immunomarquages et analyse cytofluorométrique des populations lymphocytaires.

Pour l'analyse des sous-populations lymphocytaires des poulets traités avec les surnageants de macrophages, les lymphocytes isolés, tel que décrit à la section 2.6.2, ont été ajustés à 2×10^6 cellules/ml, puis 1ml de la suspension a été ajouté à des plaques 24 puits contenant les cultures de macrophages activés ou non par le PEP et traités avec les différents oligomères (voir procédure 2.6.1.2). Les plaques ont ensuite été incubées pendant 48 heures à 39 °C.

Afin d'identifier les sous-populations lymphocytaires spléniques de poussins SPF âgés de 7 et 14 jours, et de poulets adultes traités avec les dérivés de chitosane de haut PM, des doubles immunomarquages CD4/CD8, CD3/CD8 et IgM/TCR $\gamma\delta$ ont été effectués à partir des cultures cellulaires obtenues aux sections 2.6.2.2 et 2.6.3.2. Les cellules ont été récupérées dans des microtubes de 1 ml et incubées sur glace à la noirceur durant 30 minutes en présence de $1 \mu\text{g}/10^6$ cellules d'anticorps anti-CD4 couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et/ou d'anticorps anti-CD8 couplés à la phycoérythrine (PE) et/ou d'anticorps anti-CD3 (FITC) et/ou d'anticorps anti-IgM (FITC) et/ou d'anticorps anti-TCR $\gamma\delta$ (PE) (SouthernBiotech, Birmingham, AL). Les

microtubes ont ensuite été centrifugés 1 minute à 13000 rpm et les culots ont été resuspendus dans 500 µl de formaldéhyde 1% dans du PBS (Sigma), puis conservés à 4 °C. Les niveaux de fluorescence ont été mesurés à l'aide d'un appareil FACScan (BD). Pour chaque immunomarquage 10 000 évènements ont été enregistrés. Les régions correspondant généralement aux lymphocytes selon les paramètres FSC/SSC (Forward Scatter/Side Scatter) ont été sélectionnées. Les immunomarquages ont été effectués en duplicata et soumis à une analyse multiparamétrique à l'aide du logiciel CellQuest (Becton-Dickinson).

2.11- Détermination de la cytotoxicité des dérivés de chitosane envers les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6.

2.11.1- Détermination de la nécrose cellulaire

L'activité cytotoxique des produits D, W et B a été évaluée chez des macrophages de souris C57BL/6. La nécrose des cellules en présence des oligomères à différentes concentrations a été étudiée par un test de relargage de la lactate déshydrogénase (LDH) (Roche, Laval, Qc, Canada) selon la procédure fournie par le manufacturier. Les pourcentages de cytotoxicité dus aux dérivés de chitosane ont été calculés selon l'équation suivante :

$$\% \text{ cytotoxicité} = \frac{\text{(D.O. moyenne corrigée)}}{\text{(D.O. contrôle positif - D.O. contrôle négatif)}} \times 100$$

où le contrôle négatif correspond au relargage de la LDH par les cellules cibles sans oligomères et le contrôle positif correspond au relargage induit par le Triton X-100.

2.11.2- Détermination de l'apoptose cellulaire

Le test TUNEL (Roche) permet, grâce au marquage des extrémités de l'ADN fragmentée, la détection de l'apoptose précoce. Des macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 traités avec les produits D, W et JF à différentes concentrations durant 24 hrs ont été récoltés et ajustés à une concentration de 1×10^6 cellules/ml avant d'être déposés

sur une lame de microscope préalablement enduite d'une solution d'albumine à 3% dans du PBS, et ensuite cytocentrifugée (Cytospin, Shandon Instruments, PA). Les cellules ont été fixées sur les lames par un bain de formaldéhyde 4% dans du PBS pendant 30 minutes à température de la pièce. Après deux lavages dans du PBS, les cellules ont été perméabilisées avec une solution contenant 0,1% de Triton X-100 dans 0,1% de citrate de sodium pendant 2 minutes sur glace. Par la suite, les cellules ont été colorées avec le réactif TUNEL pendant 60 minutes à 37 °C sous une atmosphère humide, selon les indications du fabricant. Les lames ont été lavées et une lamelle a été déposée sur les lames à l'aide d'un milieu de montage contenant 90% de glycérol (Fisher Scientific). La lamelle a été scellée par du vernis à ongle transparent. Les lames ont été examinées au microscope à fluorescence (Leitz Dialux 22, Midland, Ontario, Canada).

2.12- Induction d'ostéoarthrite dans un modèle murin.

Afin de vérifier les effets du produit Oligovia™ lors d'une maladie inflammatoire, l'OA a été induite chez la souris C57BL/6 à l'aide d'injections intra-articulaire et sous-cutanée de carragénine.

L'induction de l'OA a été réalisée en injectant de la carragénine 1% (Sigma) à l'aide d'une seringue de 1 ml dans l'articulation fémoro-tibiale et dans les coussinets plantaires de la patte droite de la souris sous anesthésie avec un mélange 1:1 de Kétamine (Ayerst, Guelph, On, Canada) et de Xylazine (Bayer, Toronto, On, Canada). La patte gauche a servi de contrôle pour déterminer le niveau d'inflammation de façon qualitative en comparant l'enflure des deux pattes. L'évolution de l'enflure représentative de l'état de l'inflammation a été suivie pendant 28 jours, et les animaux ont été euthanasiés par section de l'aorte abdominale sous anesthésie. L'enflure de l'articulation fémoro-tibiale a été mesurée à l'aide d'un ruban calibré de façon hebdomadaire. L'enflure du coussinet plantaire a été suivie par des photographies hebdomadaires. Lors de l'euthanasie, une empreinte de l'articulation a été faite dans un substrat de type plasticine et le volume de l'empreinte a été déterminé par la quantité de glycérol nécessaire pour combler la cavité formée par l'empreinte. Tout au long de l'expérience, le comportement des souris a été observé afin de détecter des signes de

douleur ou des symptômes notables ou justifiant une euthanasie selon les directives des points limites du Conseil Canadien de la Protection des Animaux.

Suite à l'induction d'OA par la carragénine, des groupes de souris ont reçu une fois par jour, durant 28 jours, les différents produits par voie orale dans un volume de 5 µl. Les groupes ont été divisés en groupes A à E en fonction du produit ingéré. Le groupe A, comprenant 6 souris, a été traité oralement avec du glucose (21,4 mg/kg) et a été considéré comme contrôle. Le groupe B, composé de 6 individus, a reçu le produit Oligovia™ à 1/4 de la concentration équivalente de glucose. Le groupe C a été composé de 5 individus traités avec le produit Oligovia™ à la concentration équivalente de glucose. Le groupe D a été composé de 6 individus qui ont reçu le produit Oligovia™ 4 fois la concentration équivalente en glucose. Finalement, la glucosamine à la concentration équivalente de glucose a été donnée à 6 animaux (groupe E). Toutes les souris ont été traitées durant 28 jours.

2.12.1- Utilisation d'Oligovia™ comme traitement préventif

Lors de l'évaluation des effets d'Oligovia™ comme traitement pouvant prévenir le développement de l'arthrite, les souris ont été supplémentées par voie orale avec les différents produits sur une période de 30 jours avant de recevoir une injection de carragénine 1% dans l'articulation fémoro-tibiale et dans le coussinet plantaire. Après 7 jours, le liquide synovial et le sérum ont été prélevés conformément à la procédure décrite à la section 2.5.3.

2.13- Analyses statistiques

Les expériences *in vivo* ont été réalisées chez des groupes de 4 à 6 souris et les expériences *in vitro* ont été réalisées en triplicata. Les pourcentages, les D.O. et les nombres d'évènements des différentes populations ont été comparés à ceux des contrôles, soit non-traités avec les oligomères ou activés avec des mitogènes, et ce, par un test t de Student. Le seuil de significativité a été établi à $p < 0,05$.

3- RÉSULTATS

3.1- Effets des dérivés de chitosane dans un modèle d'ostéoarthrite murin.

La glucosamine est réputée pour avoir des propriétés anti-inflammatoires pour les problèmes ostéoarthritiques subcliniques ou chroniques. Bien que cette propriété demeure controversée, nous avons voulu vérifier au départ si les dérivés de chitosane produits par ISM Biopolymer Inc. pouvaient exprimer de telles propriétés anti-inflammatoires. Afin d'évaluer les effets des dérivés de chitosane sur l'OA, un modèle *in vivo* d'OA expérimentale a été utilisé chez la souris. Une OA aiguë a été induite chez des souris C57BL/6 par l'injection de carragénine 1% dans l'articulation fémoro-tibiale et dans les tissus mous du coussinet plantaire. Les souris ont été traitées par voie orale avec des dérivés de chitosane de la compagnie ISM Biopolymer Inc. (OligoviaTM; produit W) selon deux scénarios : 1) suite à l'induction de l'OA et 2) comme traitement préventif avant l'induction de l'OA. Les effets anti-inflammatoires de ce produit ont été évalués, lors du premier scénario, durant une période de 28 jours après l'injection de carragénine. Des groupes de souris contrôle ne recevant que du glucose, ou traités à la glucosamine-HCl ont été ajoutés à l'étude. L'approche préventive, pour sa part, a été évaluée en injectant la carragénine après la prise orale des différents produits durant 30 jours et l'inflammation a été suivie durant 7 jours.

3.1.1- Effets des dérivés de chitosane sur l'enflure de l'articulation fémoro-tibiale induite par la carragénine à 1%.

L'enflure des tissus articulaires, en plus de la douleur, sont des symptômes importants dans les pathologies arthritiques et peuvent entraîner chez les sujets de l'inconfort et une perte de fonction. Le niveau de l'enflure peut être considéré comme représentatif du degré d'inflammation. L'enflure de l'articulation fémoro-tibiale et du coussinet plantaire a été suivie de façon hebdomadaire durant toute la durée des expériences. Pour ce faire, la circonférence de l'articulation fémoro-tibiale des souris C57BL/6 injectées avec de la carragénine a été mesurée à différents temps, soit le jour 0 suite à l'injection de carragénine et les jours 1, 7, 14, 21 et 28 jours après le début de l'administration des traitements. Les différences entre les niveaux d'enflure après

l'injection et aux différents temps de traitement ont été calculées pour chacune des souris.

La figure 3 présente les mesures d'enflure de l'articulation fémoro-tibiale observées dans le temps suite à l'administration des produits testés, soit une solution de glucose comme contrôle de l'OA, le produit Oligovia™ à trois concentrations et le chlorure de glucosamine. Les observations préliminaires suggèrent que les souris traitées avec le glucose depuis 24 hres présentent une enflure qui atteint son plus haut niveau à 7 jour post-traitement et qui ne diminue qu'après 14 jours. Toutefois, l'enflure est toujours présente au jour 21. Le produit Oligovia™ semble diminuer l'enflure dès le premier jour comparativement à ce qui est observé avec le glucose et ce, avec les trois concentrations testées, quoique la variation individuelle ne permette pas un résultat statistiquement significatif. Comme pour les autres traitements, l'enflure atteint un maximum 7 jours après le traitement avec le produit Oligovia™. Par contre, le produit Oligovia™ entraîne une résorption de l'enflure dès le 14e jour du traitement chez la plupart des animaux. D'autre part, l'action du produit Oligovia™ ne semble pas varier selon la dose. La glucosamine présente la plus faible enflure au premier jour suivant l'induction d'OA avec la carragénine 1%. Cependant, l'enflure des animaux traités avec la glucosamine est légèrement plus élevée en moyenne durant les premiers 7 jours comparativement aux animaux traités avec l'Oligovia™. Par contre, l'enflure semble diminuer de façon légèrement plus forte en moyenne avec la glucosamine.

La figure 4 montre l'enflure des coussinets plantaires de souris C57BL/6 traités avec du glucose (1) de la glucosamine (2) et le produit Oligovia™ (3) à 72 heures (A) 14jrs (B) 21 jours (C) et 28 jours (D) suivant l'injection de 200 µl de carragénine 1% dans les coussinets plantaires. Les figures 1A, 2A et 3A montrent que l'enflure est sensiblement la même indépendamment du traitement utilisé et cette enflure augmente dans le temps. Le produit Oligovia™ semble rétablir un peu plus efficacement l'apparence des coussinets plantaires que les autres produits, tel que montré aux figures

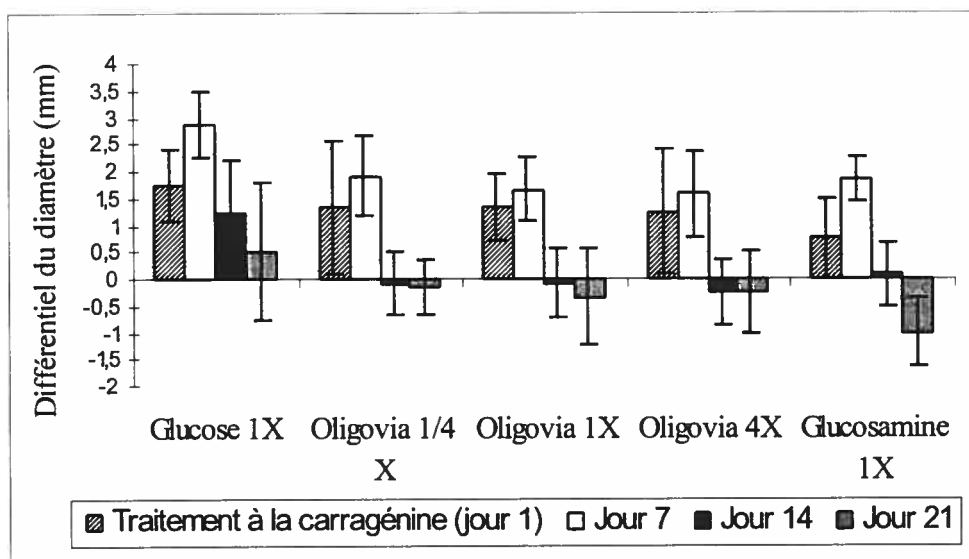


Figure 3: Evolution de l'enflure de l'articulation fémoro-tibiale de souris C57BL/6 injectées avec de la carragénine à 1% puis traitées oralement avec une solution de glucose, le dérivés de chitosane OligoviaTM à différentes concentrations (1/4X, 1X et 4X) et le chlorure de glucosamine. L'enflure différentielle a été évaluée par la mesure en mm de la circonférence de l'articulation fémoro-tibiale injectée à différents temps de traitement moins celle après l'injection de carragénine. Chaque groupe était constitué de 6 souris.

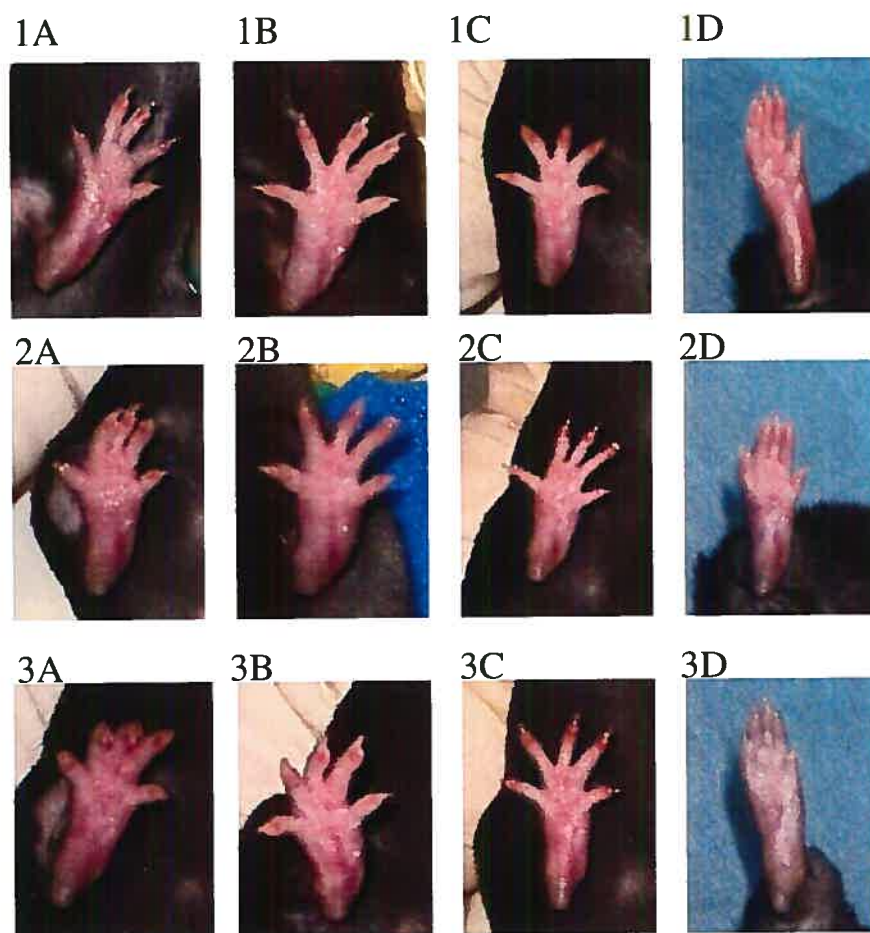


Figure 4: Evaluation qualitative des effets du glucose (1) du chlorure de glucosamine (2) et du dérivé de chitosane Oligovia™ (3) sur les coussinets plantaires de souris C57BL/6 72 hres (A), 14jrs (B), 21 jrs (C) et 28 jrs (D) après l'injection de carragénine à 1%.

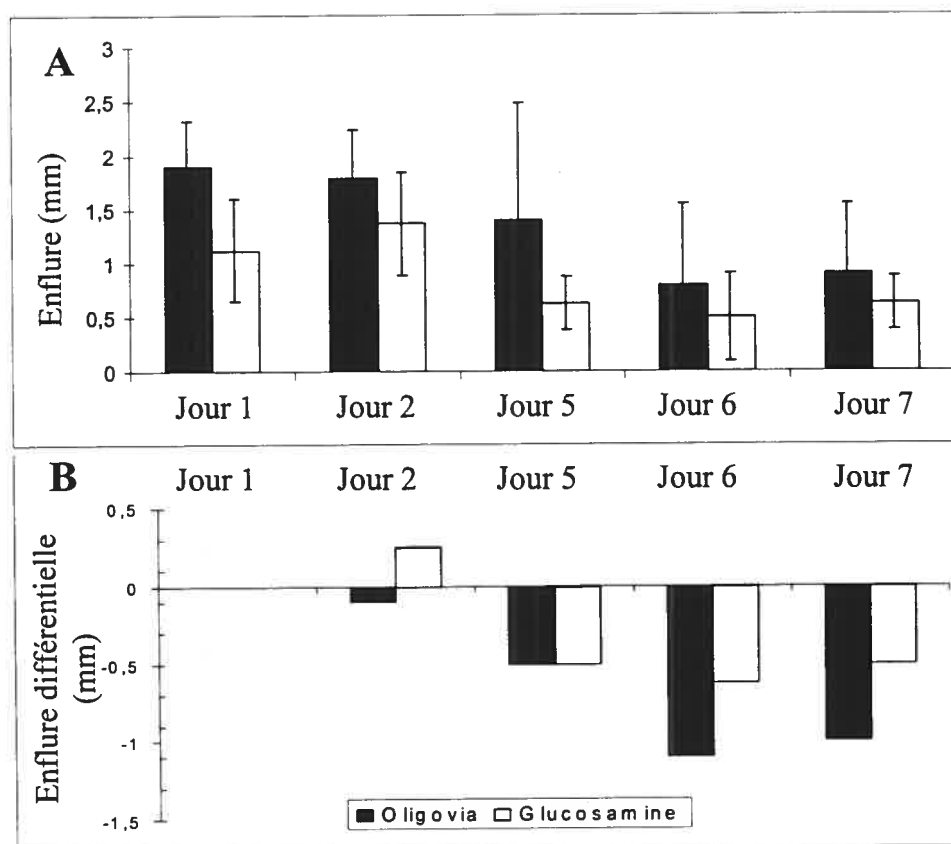


Figure 5: Évolution de l'enflure (A) et par rapport au temps post-injection (jour 1) (B) de l'articulation fémoro-tibiale de souris C57BL/6 préalablement traitées avec le produit OligoviaTM et le chlorure de glucosamine durant 30 jours avant l'injection de carragénine à 1%. L'enflure a été évaluée par la mesure en mm de la circonférence de l'articulation fémoro-tibiale. L'enflure différentielle a été évaluée par la mesure en mm de la circonférence de l'articulation fémoro-tibiale injectée à différents temps de traitement moins celle après l'injection de carragénine. Chaque groupe était constitué de 6 souris.

1D, 2D et 3D, car l'écartèlement des doigts est un élément facilement visible du niveau d'enflure. Il s'agit toutefois d'observations préliminaires à nature qualitative.

Dans un deuxième temps, des groupes de souris C57BL/6 ont reçu oralement des dérivés de chitosane (Oligovia™) ou du chlorure de glucosamine durant 30 jours et l'OA expérimentale a ensuite été induite par l'injection de carragénine 1% dans l'articulation fémoro-tibiale. La figure 5 montre l'évolution de l'enflure (A) et de l'enflure différentielle par rapport au jour 1 (B) de l'articulation fémoro-tibiale de souris C57BL/6. Ces premières observations suggèrent que le produit Oligovia™ pourrait entraîner une diminution de l'enflure de manière plus efficace suite à l'injection de carragénine que la glucosamine même si l'enflure aux jours 1 et 2 paraissait plus forte (Fig. 5A).

Ces résultats, quoique statistiquement non-significatifs selon les méthodes de mesure et le nombre d'animaux utilisés, soulèvent la possibilité d'une activité anti-inflammatoire pour l'Oligovia™.

3.1.2- Production de cytokines par les dérivés de chitosane dans un modèle *in vivo* d'arthrite induite par la carragénine à 1 %.

Dans le but de déterminer si les dérivés de chitosane pouvaient moduler les cytokines impliquées dans les pathologies arthritiques, les niveaux d'IL-6, d'IL-10 et de PGE₂ ont été mesurés dans le sang et le liquide synovial de souris C57BL/6 à l'aide de tests ELISA suite à l'euthanasie à 28 jours après les différents traitements.

La figure 6A présente dans un premier temps les niveaux de cytokines dans le liquide synovial de l'articulation fémoro-tibiale injectée avec de la carragénine 28 jours auparavant (traitement curatif; groupes A à E). Aucune production d'IL-6 n'a été observée dans le liquide articulaire des souris contrôles ayant reçu du glucose par voie orale (groupe A). Les souris ayant reçu une supplémentation orale d'Oligovia™ à différentes concentrations (groupe B à D) durant 28 jours après l'injection de

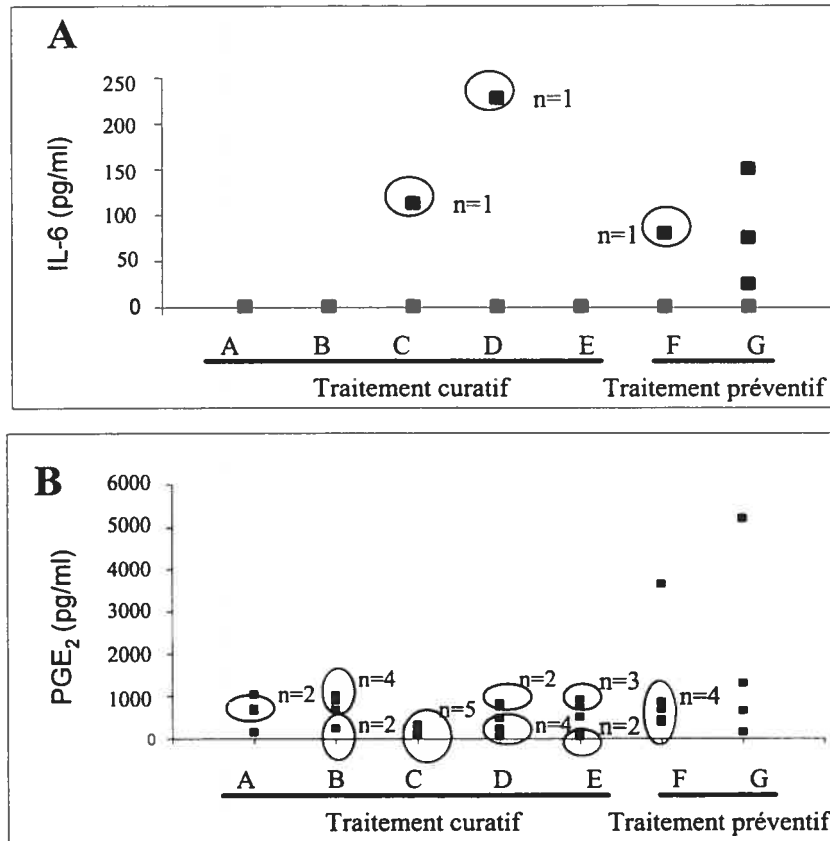


Figure 6: Production d'IL-6 (A) et de PGE₂ (B) dans le liquide synovial de souris C57BL/6 lors d'une ostéoarthrite induite par la carragénine 1% précédé (préventif) ou suivi (curatif) de l'administration de différents dérivés de chitosane durant 30 et 28 jours respectivement. Glucose 1X n=4 (A), OligoviaTM 1/4X n=6 (B), OligoviaTM 1X n=5 (C), OligoviaTM 4X n=6 (D), Glucosamine 1X n=6 (E), OligoviaTM 4X n=5 (F) et Glucosamine 1X n=4 (G). Les quantités d'IL-6 et de PGE₂ ont été mesurées à l'aide de tests ELISA.

carragénine n'ont montré aucune production d'IL-6 sauf pour un individu dans le groupe C, correspondant au traitement avec le produit Oligovia 1X et un autre dans le groupe D avec le produit Oligovia 4X. De façon similaire, aucune quantité d'IL-6 n'a été détectée après 28 jours de traitement avec la glucosamine. La figure 6A présente également les niveaux d'IL-6 mesurés dans le liquide synovial des souris ayant reçu les produits dans un contexte préventif (groupes F et G). Comme dans le traitement curatif, l'utilisation du glucose dans un contexte préventif (résultat non montré) n'a pas entraîné la production d'IL-6 dans l'articulation fémoro-tibiale. Par contre, 3 des 4 individus ayant été traité de façon préventive avec la glucosamine (groupe G) ont démontré la présence d'IL-6 dans leur liquide synovial alors qu'un seul traité à l'OligoviaTM (groupe F) s'est avéré positif.

La PGE₂ a aussi été dosée dans le liquide intra-articulaire des souris dans les différents groupes. Tel que montré à la figure 6B, le liquide synovial des souris contrôles traitées durant 28 jours avec le glucose après l'injection de la carragénine contenait de la PGE₂ chez la plupart des individus. Le traitement C (Oligovia 1X) a entraîné la plus faible production de PGE₂. Toutefois, à une plus faible concentration (groupe B ; Oligovia 1/4X) ou plus forte (groupe D ; Oligovia 4X), la diminution de la production de PGE₂ était plus faible. Les niveaux de PGE₂ chez les souris ayant reçu de la glucosamine (groupe E) étaient comparables à ceux des souris contrôles. Les traitements préventifs par le glucose (résultats non-montrés), l'OligoviaTM (groupe F) ou la glucosamine (groupe G) n'ont pas entraîné de différences significatives quand à la capacité de ces produits à contrôler la production de PGE₂.

D'autre part, l'utilisation préalable d'OligoviaTM ou de glucosamine, ou suite à l'injection de carragénine a entraîné des effets différents sur la production intra-articulaire d'IL-10. En effet, tel que montré à la figure 7, l'administration par voie orale du produit OligoviaTM et de la glucosamine pendant 30 jours avant l'injection de carragénine et d'une euthanasie 7 jours après l'injection (traitement préventif) a assuré une production plus forte d'IL-10 comparativement à ce qui a été observé lorsque les produits étaient administrés pendant 28 jours après l'injection de carragénine. Aussi bien

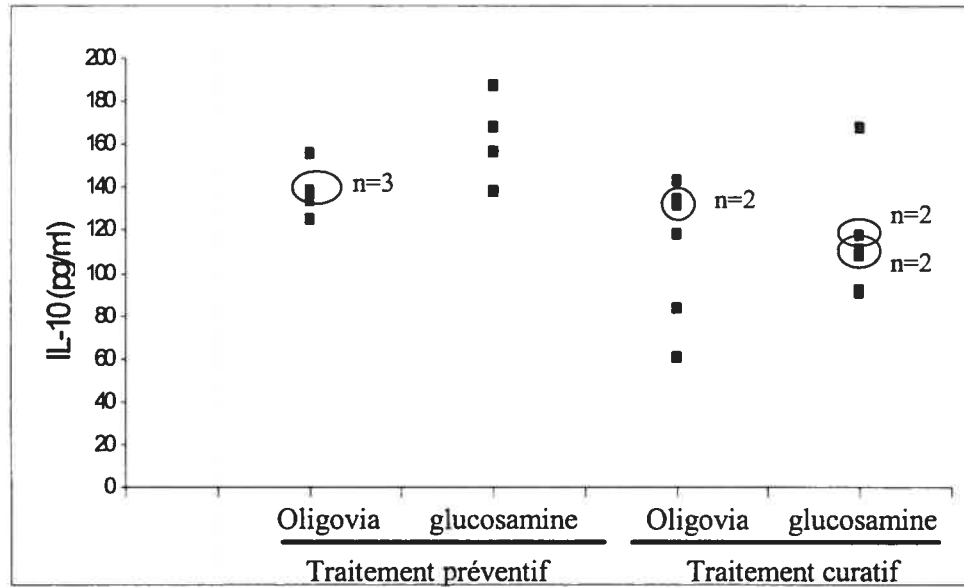


Figure 7: Production d'IL-10 dans le liquide synovial de souris C57BL/6 lors d'une ostéoarthrite induite par de la carragénine 1% précédé (préventif) ou suivi (curatif) de l'administration de l'Oligovia™ 4X ou de la glucosamine 1X durant 30 et 28 jours respectivement. Les quantités d'IL-10 ont été mesurées à l'aide d'un test ELISA. Les expériences ont été effectuées en triplicata.

dans le traitement préventif que curatif, la glucosamine et le produit Oligovia™ ont augmenté la production d'IL-10 par rapport au glucose dont la production variait de 50 à 75 pg/ml en fonction des individus (résultats non montrés). Toutefois, les niveaux d'IL-10 étaient légèrement plus élevés chez les souris ayant reçu de la glucosamine dans les deux scénarios.

Les niveaux de TNF- α , d'IL-6 et de PGE₂ ont également été mesurés dans le sérum suite à l'induction d'ostéoarthrite à la carragénine. Toutefois, aucune cytokine n'y a été détectée (résultats non montrés).

3.2- Effets *in vitro* des dérivés de chitosane sur les macrophages murins.

3.2.1- Détermination de la présence d'apoptose et/ou de nécrose dans les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 traités avec les différents dérivés de chitosane.

Avant de déterminer les effets de ces produits sur la production de cytokines par différents types de cellules, la cytotoxicité potentielle des dérivés de chitosane, telle que l'induction d'apoptose et/ou de nécrose, a été évaluée. Ainsi, des macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 ont été mis en culture en présence de différentes concentrations des dérivés de chitosane pour une période de 24 heures. La nécrose a été évaluée par le relargage de la LDH. Tel que montré à la figure 8A, le produit W (Oligovia™) tend à diminuer la nécrose naturelle des cellules, et ce à toutes les concentrations étudiées. Par contre, le produit D (glucosamine) a présenté une faible activité nécrotique sur les cellules à des concentrations variant de 5 à 20 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,05$). Le produit B (ISM Biopolymer Inc.) semble également diminuer la nécrose des macrophages péritonéaux à faible ou forte concentration.

La présence de cellules apoptotiques a été mise en évidence par le test TUNEL-peroxydase. Tel qu'observé dans la figure 8B, tous les produits testés, à une concentration de 1,25 $\mu\text{g/ml}$, ont diminué l'apoptose spontanée des cellules. L'effet le plus marqué est obtenu avec le produit W qui, à la plus faible concentration testée, a entraîné une diminution de l'apoptose de près de 30% comparativement aux cellules non

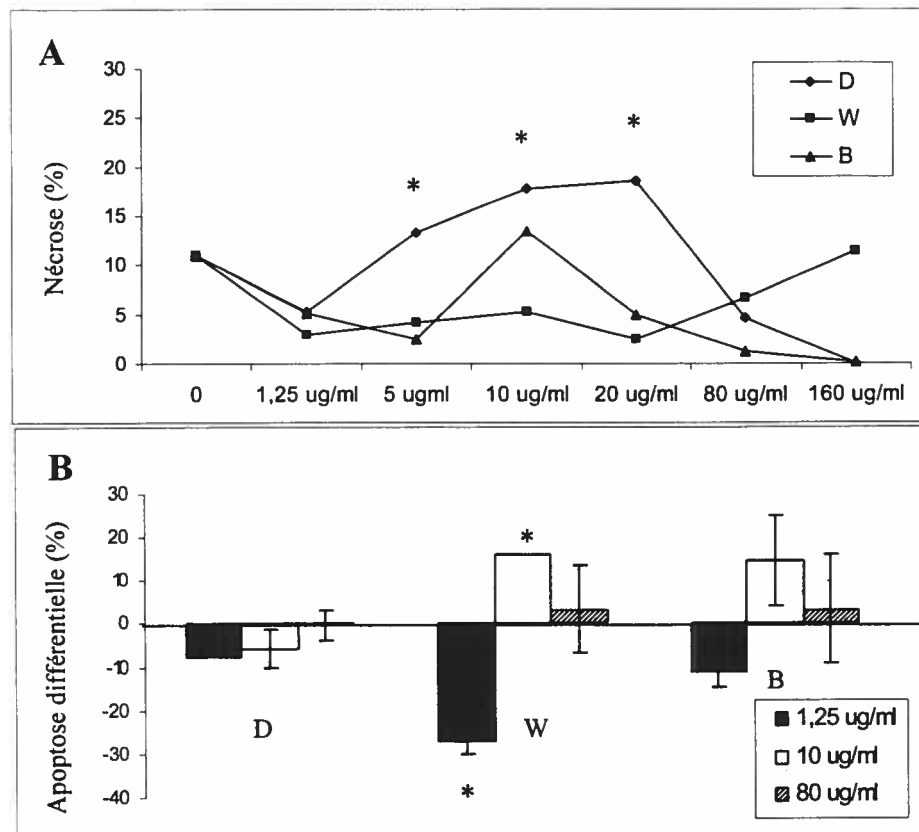


Figure 8: Cytotoxicité par nécrose (A) ou par apoptose différentielle par rapport au contrôle (B) induite par les produits D, W et B à différentes concentrations chez des macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 durant 24 hres. L'apoptose a été évaluée par un test TUNEL-peroxydase alors que la nécrose a été déterminée par le relargage de la LDH. Les expériences ont été réalisées en triplicata. (* $p < 0,05$)

traitées ($p < 0,05$). Par contre, le produit W à une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ a favorisé une légère augmentation de l'apoptose spontanée ($p < 0,05$). C'est également le cas du produit B qui semble augmenter l'apoptose à des niveaux qui demeurent toutefois inférieurs à ce qui a été obtenu avec le produit W.

3.2.2- Activation des lymphocytes spléniques de souris C57BL/6 en réponse aux différents dérivés de chitosane.

Les effets des différents dérivés de chitosane sur l'activité métabolique des lymphocytes spléniques ont aussi été vérifiés. Des lymphocytes spléniques ont été mis en contact avec les produits A, B, AB, D et W d'ISM Biopolymer Inc. et le niveau d'activité métabolique a été mesuré 48 hres plus tard, suite à l'ajout de MTS/PMS. Aucun des produits n'a entraîné une augmentation de l'activité des déshydrogénases mitochondriales (test MTS/PMS), aussi bien en absence qu'en présence de PEP (résultats non-montrés).

Afin de vérifier si les dérivés de chitosane peuvent stimuler les lymphocytes via des substances produites par les macrophages, des lymphocytes spléniques de souris C57BL/6 ont été mis en culture en présence de surnageants de macrophages péritonéaux préalablement traités pendant 24 heures avec différentes concentrations des produits A, B, AB, D et W. Des cellules ont aussi été traitées avec des surnageants de macrophages stimulés avec du LPS et du PEP comme contrôles positifs. L'activité métabolique des lymphocytes a été mise en évidence après 48 hres par le test MTS-PMS. Tel que montré dans la figure 9A, l'activité métabolique des lymphocytes a augmenté en présence des surnageants de macrophages traités avec du LPS, du PEP, ou les oligomères de chitosane ($p < 0,05$). L'effet le plus marqué a été obtenu avec les surnageants de macrophages traités avec le produit AB qui, à certaines concentrations, présente un effet légèrement supérieur à celui des produits A et B étudiés séparément. Les plus faibles potentiels de stimulation lymphocytaires sont obtenus avec les produit D et W, particulièrement le produit W à 40 $\mu\text{g/ml}$.

L'activité métabolique des lymphocytes a également été étudiée lors de leur mise en culture en présence de surnageants de macrophages péritonéaux préalablement activés avec du PEP et traités avec les dérivés de chitosane. Tel que montré à la figure 9B, les surnageants de macrophages en présence du LPS ou du PEP seuls ont augmenté la prolifération des lymphocytes par rapport aux lymphocytes non traités (contrôle cellulaire) ($p < 0,05$ à $0,01$). Par contre, les surnageants de macrophages activés par le PEP en présence des dérivés de chitosane diminuent la stimulation lymphocytaire causée par les macrophages activés par le PEP seul. La plus forte inhibition est obtenue avec le produit A qui présente un effet dose-dépendant ($p < 0,05$). Le produit W a également entraîné une diminution de l'activité des lymphocytes qui semble être dose-dépendante mais à des niveaux comparables aux autres produits.

3.2.3- Effet des dérivés de chitosane sur la sécrétion de cytokines par les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6.

Dans le but de vérifier si la stimulation blastique des lymphocytes par les surnageants de macrophages traités avec les dérivés de chitosane résulte de différences dans la production de cytokines macrophagiques, des macrophages activés ou non avec du PEP ont été traités avec différentes concentrations des produits A, B, D, W et JF (polymérisation du produit W) durant 24 heures. Des macrophages non-activés ont aussi été traités avec du LPS ou du PEP comme contrôles positifs. Les cytokines pro-inflammatoires, TNF- α , IL-12 et IL-6 ainsi que les cytokines anti-inflammatoires IL-10, TGF- β 1 et PGE₂ sécrétées dans les surnageants des macrophages traités ont été quantifiées par des tests ELISA.

3.2.3.1- Le TNF- α

L'analyse de la figure 10A montre, dans un premier temps, que le LPS et le PEP ont augmenté la production de TNF- α par les macrophages ($p < 0,01$). Le produit JF est celui qui a entraîné la plus forte production de TNF- α et ce, de façon dépendante de la concentration ($p < 0,05$ à $0,01$). Par contre, l'augmentation du TNF- α par les différentes concentrations du produit JF est demeurée à des niveaux inférieurs à ceux atteints par le LPS et le PEP. Le produit W a aussi entraîné une augmentation de TNF- α mais à des

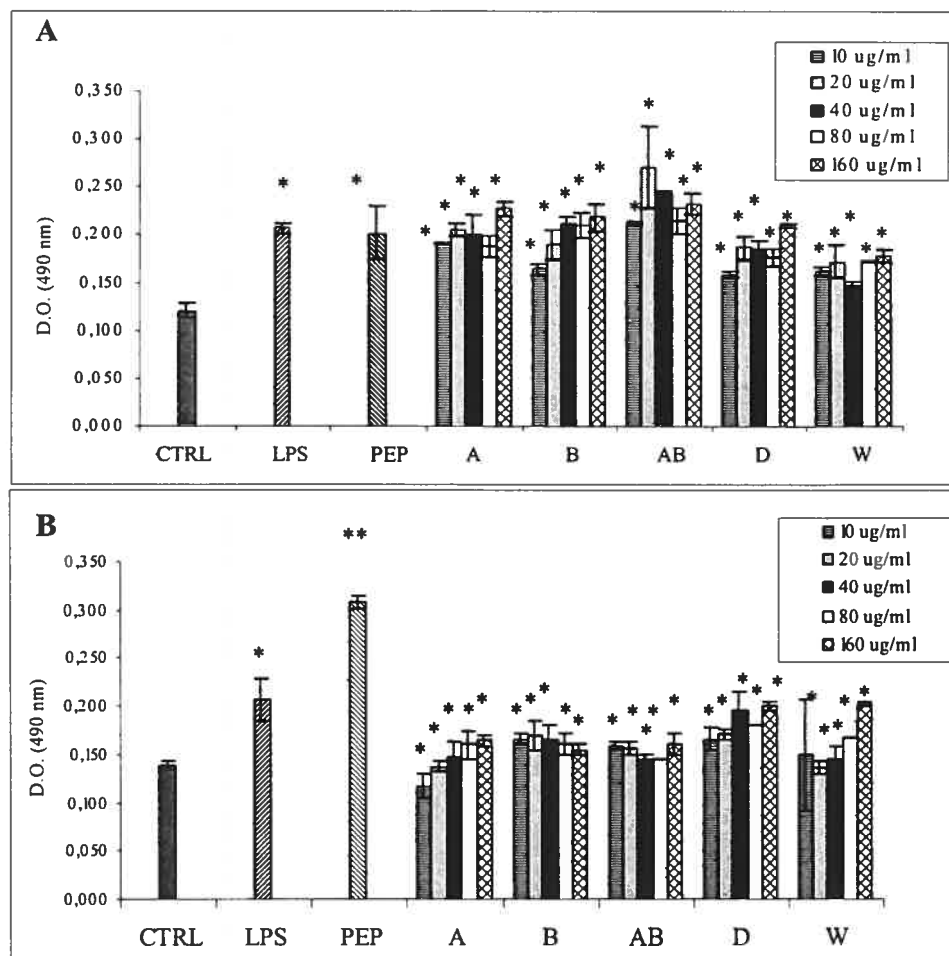


Figure 9: Activité métabolique des lymphocytes spléniques de souris C57BL/6 en présence de surnageants de macrophages péritonéaux non-stimulés (A) ou stimulés par le PEP (10 µg/ml) (B) en présence des différents dérivés de chitosane sur un période de 48 hrs. L'activité des lymphocytes a été évaluée par un test MTS-PMS. Les résultats ont été comparés à la valeur du contrôle en (A) alors qu'ils ont été comparés à la valeur du PEP en (B). Les expériences ont été réalisées en triplicata. (*p<0,05 **p<0,01)

niveaux très faibles et ne variant pas avec la concentration. Le produit D correspondant à la glucosamine a stimulé très faiblement la production de TNF- α à la plus faible concentration testée seulement ($p < 0,05$). Aucune stimulation du TNF- α n'a été mise en évidence avec les différentes concentrations des produits A et B.

Dans un deuxième temps, les effets des dérivés de chitosane sur la production de TNF- α ont été évalués chez des macrophages préalablement activés avec le PEP afin de vérifier si les dérivés de chitosane pouvaient, au contraire, diminuer la production de TNF- α . Tel que montré à la figure 10B, les macrophages activés par le LPS et le PEP ont bien entraîné la production de TNF- α ($p < 0,05$). Par contre, seul le produit A à une concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$ a augmenté la production de TNF- α par les macrophages déjà activés par le PEP ($p < 0,05$). Cette augmentation demeure toutefois très faible. Aucun autre dérivé de chitosane n'a inhibé ou supprimé la production de TNF- α induite par le PEP et ce, à toutes les concentrations testées.

3.2.3.2- L'IL-6

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans plusieurs fonctions dont la stimulation de certaines populations des lymphocytes B et T. Cette cytokine a été quantifiée dans les surnageants de macrophages non-activés et activés par le PEP en présence des dérivés de chitosane. L'analyse de la figure 11A révèle que les macrophages non-activés ont augmenté leur production d'IL-6 suite à leur stimulation par le LPS et le PEP ($p < 0,01$). La production d'IL-6 la plus importante a été obtenue avec le produit JF ($p < 0,01$), atteignant des niveaux comparables à ceux du LPS et du PEP. L'IL-6 a été légèrement augmentée par les fortes concentrations du produit W ($p < 0,05$), alors que la plus faible concentration a plutôt légèrement inhibé la production d'IL-6. Toutefois, la production d'IL-6 induite par le produit W à fortes concentrations s'est avérée inférieure à celles atteintes par le LPS et le PEP. Les produits A et B, à des concentrations variant de 10 à 80 $\mu\text{g/ml}$, ont inhibé légèrement la production d'IL-6 ($p < 0,05$) à l'exception de la concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$ du produit B où une faible stimulation de la production d'IL-6 a été observée ($p < 0,05$). Aucune stimulation ou

inhibition de l'IL-6 n'a été mise en évidence avec les différentes concentrations du produit D.

Dans un deuxième temps, afin de vérifier si les dérivés de chitosane pouvaient, au contraire, diminuer la production d'IL-6 par les macrophages activés, les macrophages péritonéaux ont été stimulés par le PEP et traités avec différentes concentrations de dérivés de chitosane, incluant le produit AB. Tel que montré à la figure 11B, l'activation des macrophages par le LPS et le PEP a bien induit la production d'IL-6 ($p < 0,001$). Les dérivés de chitosane n'ont généralement pas été capables d'inhiber la production d'IL-6 induite par le PEP sauf à la concentration 20 $\mu\text{g/ml}$ du produit A ($p < 0,05$), par le produit B à des concentrations allant de 10 à 80 $\mu\text{g/ml}$ et à des concentrations de 10 et 80 $\mu\text{g/ml}$ du produit D ($p < 0,05$). L'inhibition de la production d'IL-6 est toutefois très faible et elle est la même pour ces trois produits. Par contre, les produits AB, W et JF n'ont pas altéré la production d'IL-6 induite par le PEP et ce, à des concentrations variant de 10 à 160 $\mu\text{g/ml}$.

3.2.3.3- L'IL-12

L'IL-12 est une cytokine pro-inflammatoire favorisant surtout l'activation des lymphocytes CD4 Th1. Le traitement des macrophages péritonéaux avec les différents dérivés de chitosane n'a stimulé aucune production d'IL-12. Le LPS et le PEP n'ont pas entraîné la production de cette cytokine (données non présentées). Des résultats similaires ont été observés chez des macrophages préalablement activés avec le PEP en présence des différents dérivés de chitosane.

3.2.3.4- L'IL-10

Parmi les cytokines immunosuppressives, l'IL-10 est une des plus importantes dans la tolérance immunologique. L'analyse de la figure 12A montre, dans un premier temps, que le LPS et le PEP ont stimulé la production d'IL-10 par les macrophages péritonéaux ($p < 0,01$ à $0,001$). Les produits B, AB, D et W ont aussi entraîné une augmentation d'IL-10 mais à des niveaux très faibles et ne variant peu ou pas avec la

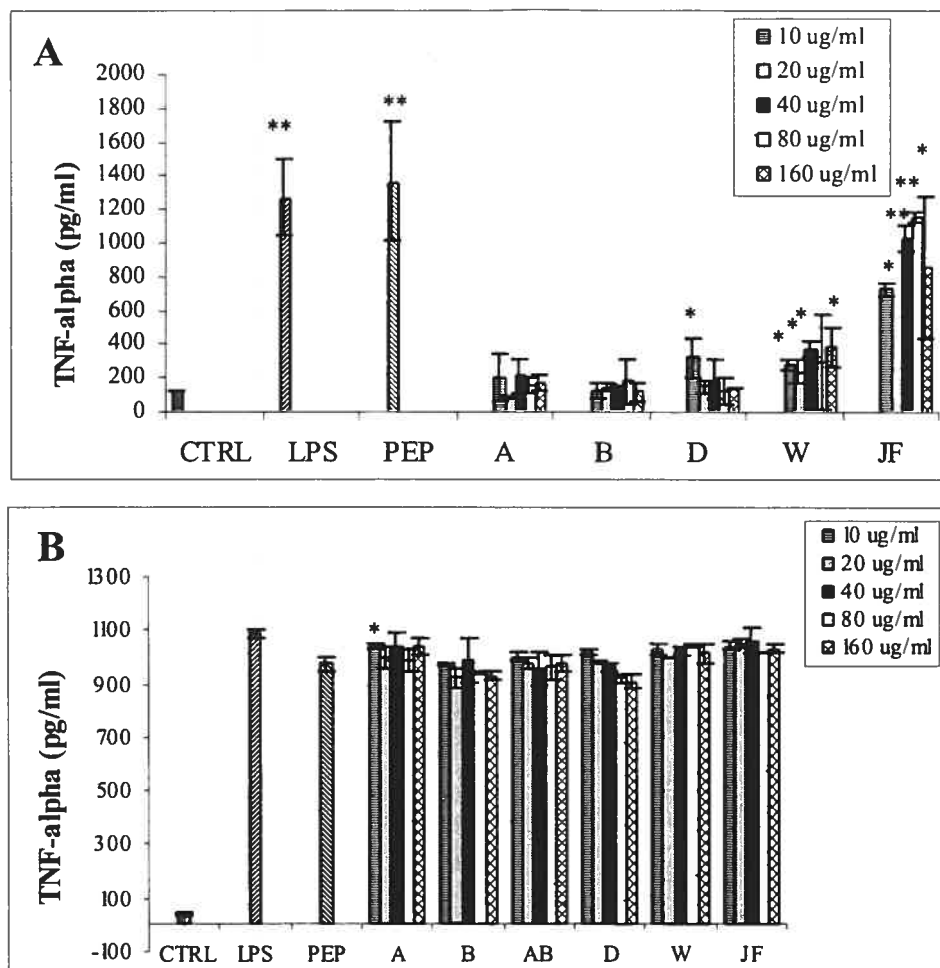


Figure 10: Production de TNF- α par les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 non-stimulés (A) ou stimulés par le PEP (10 μ g/ml) (B) en présence des différents dérivés de chitosane durant 24 heures. Les quantités de TNF- α ont été mesurées par un test ELISA. Les expériences ont été réalisées en triplicata. Les niveaux de TNF- α des macrophages traités avec les dérivés de chitosane ont été comparés à ceux des cellules contrôles (10A) ou activées avec le PEP (10B). (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$).

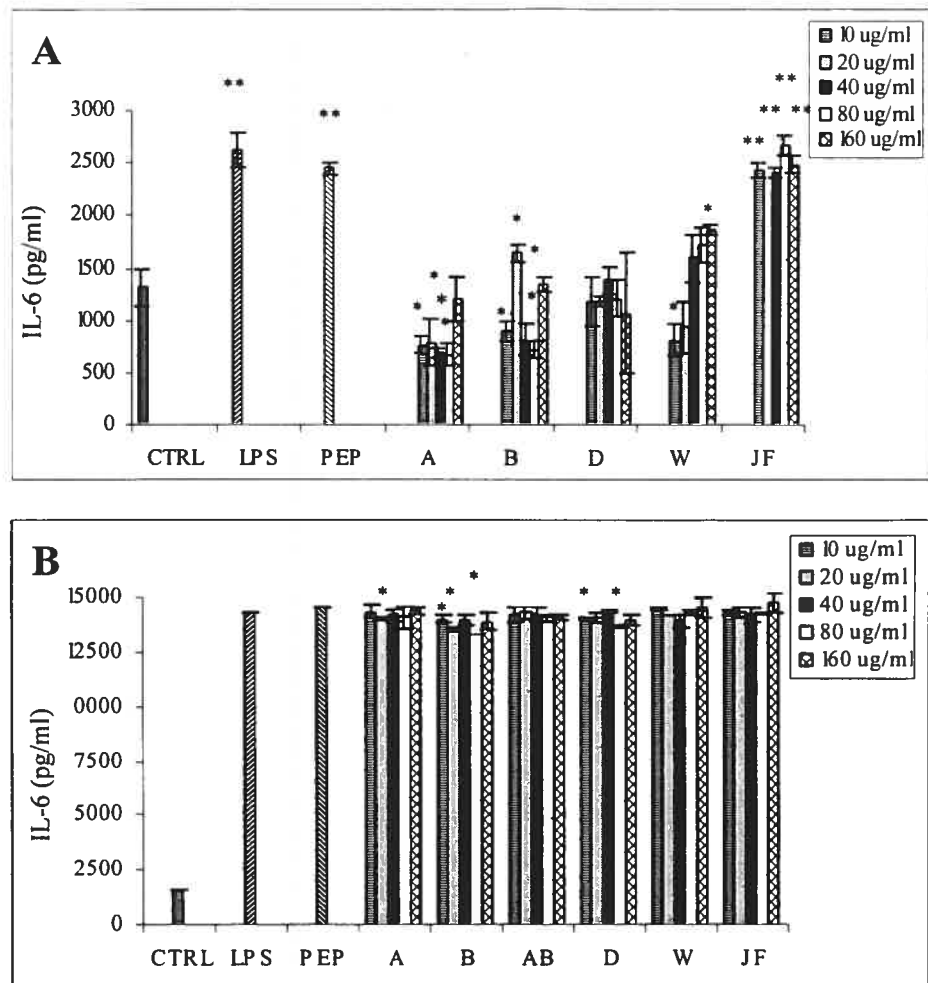


Figure 11: Production d'IL-6 par les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 non-stimulés (A) ou stimulés par le PEP (10 µg/ml) (B) en présence des différents dérivés de chitosane durant 24 hrs. Les quantités d'IL-6 ont été mesurées par un test ELISA. Les expériences ont été réalisées en triplicata. Les niveaux d'IL-6 des macrophages traités avec les dérivés de chitosane ont été comparés à ceux de cellules contrôles (11A) ou activées avec le PEP (11B). (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$)

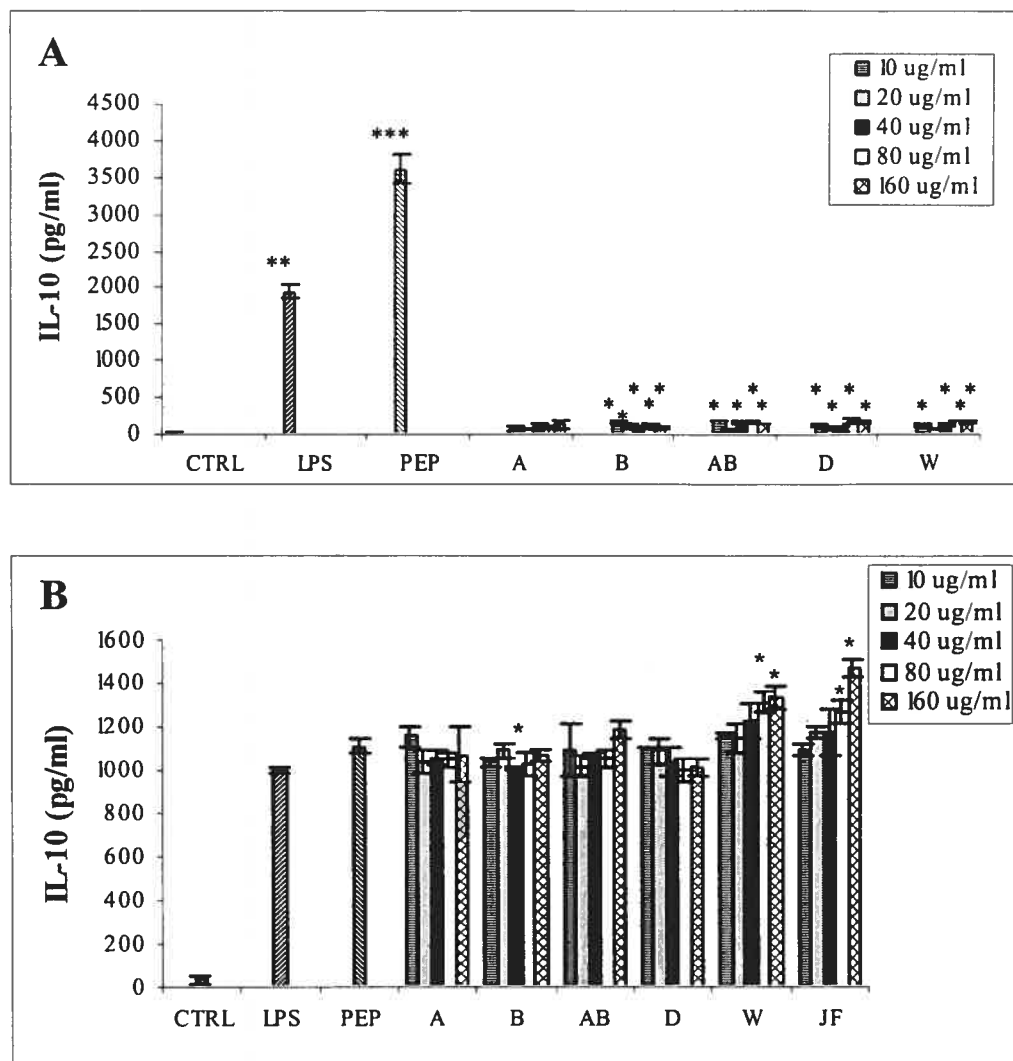


Figure 12: Production d'IL-10 par les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 non-stimulés (A) ou stimulés par le PEP (10 µg/ml) (B) en présence des différents dérivés de chitosane durant 24 hrs. Les quantités d'IL-10 ont été mesurées par un test ELISA. Les expériences ont été réalisées en triplicata. Les niveaux d'IL-10 des macrophages traités avec les dérivés de chitosane ont été comparés à ceux des cellules contrôles (12A) ou activées avec le PEP (12B). (*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001)

concentration ($p < 0,05$), alors que le produit A n'a eu aucun effet sur la production d'IL-10 par les macrophages péritonéaux.

Dans un deuxième temps, afin de vérifier si les dérivés de chitosane pouvaient augmenter le niveau de production d'IL-10 par les macrophages déjà activés, les macrophages péritonéaux ont été stimulés par le PEP et traités avec les différentes concentrations de dérivés de chitosane. Tel que montré à la figure 12B, le LPS et le PEP ont bien entraîné la production d'IL-10 par rapport aux cellules non traitées ($p < 0,01$). Les produits W et JF, à des concentrations de 80 et 160 $\mu\text{g/ml}$, ont augmenté la production d'IL-10 à des niveaux supérieurs à ceux obtenus avec le LPS et le PEP seuls ($p < 0,05$). Par contre, la production d'IL-10 des macrophages activés a légèrement été inhibée par le produit B à une concentration de 40 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,05$). Les produits A, AB et D n'ont eu aucun effet sur la production d'IL-10 chez les macrophages activés.

3.2.3.5- Le TGF- β 1

Le TGF- β est une autre cytokine suppressive très importante dans les fonctions immunologiques comme l'immunité mucoale en augmentant de 10 à 20 fois de la production d'IgA, l'isotype majeur dans la sécrétion des muqueuses. L'analyse de la figure 13 révèle que la production de TGF- β 1 par les macrophages péritonéaux non-activés de souris C57BL/6 a été augmentée suite à leur stimulation par le LPS et le PEP ($p < 0,05$ à $0,01$). Le produit W aux plus fortes concentrations testées et le produit AB à une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,05$) ont entraîné la production TGF- β 1 pour atteindre des niveaux semblables à ceux obtenus avec le LPS. Les produits A et B ont aussi entraîné une légère augmentation ($p < 0,05$) sauf à la concentration 20 $\mu\text{g/ml}$, alors que le produit D n'a stimulé que faiblement la production de TGF- β 1 à 20, 80 et 160 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,05$).

3.2.3.6- La PGE₂

La PGE₂, en plus d'être impliquée dans la régulation de plusieurs processus physiologiques incluant l'agrégation des plaquettes, le relâchement de neurotransmetteurs et la douleur, joue également un rôle important dans la modulation

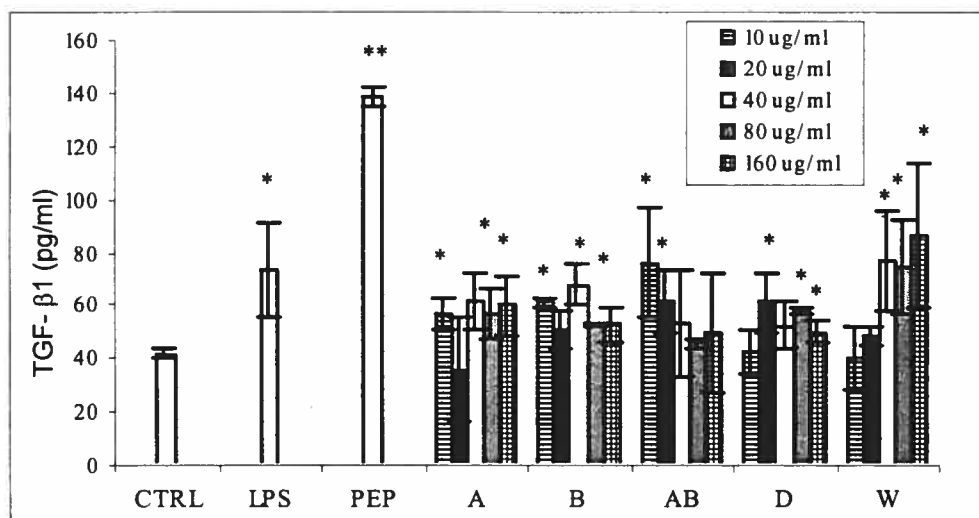


Figure 13: Production de TGF- β 1 par les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 en présence des différents dérivés de chitosane durant 24 heures. Les quantités de TGF- β 1 ont été mesurées par un test ELISA. Les expériences ont été réalisées en triplicata. Les niveaux TGF- β 1 des macrophages traités avec les dérivés de chitosane ont été comparés à ceux des cellules contrôles. (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$)

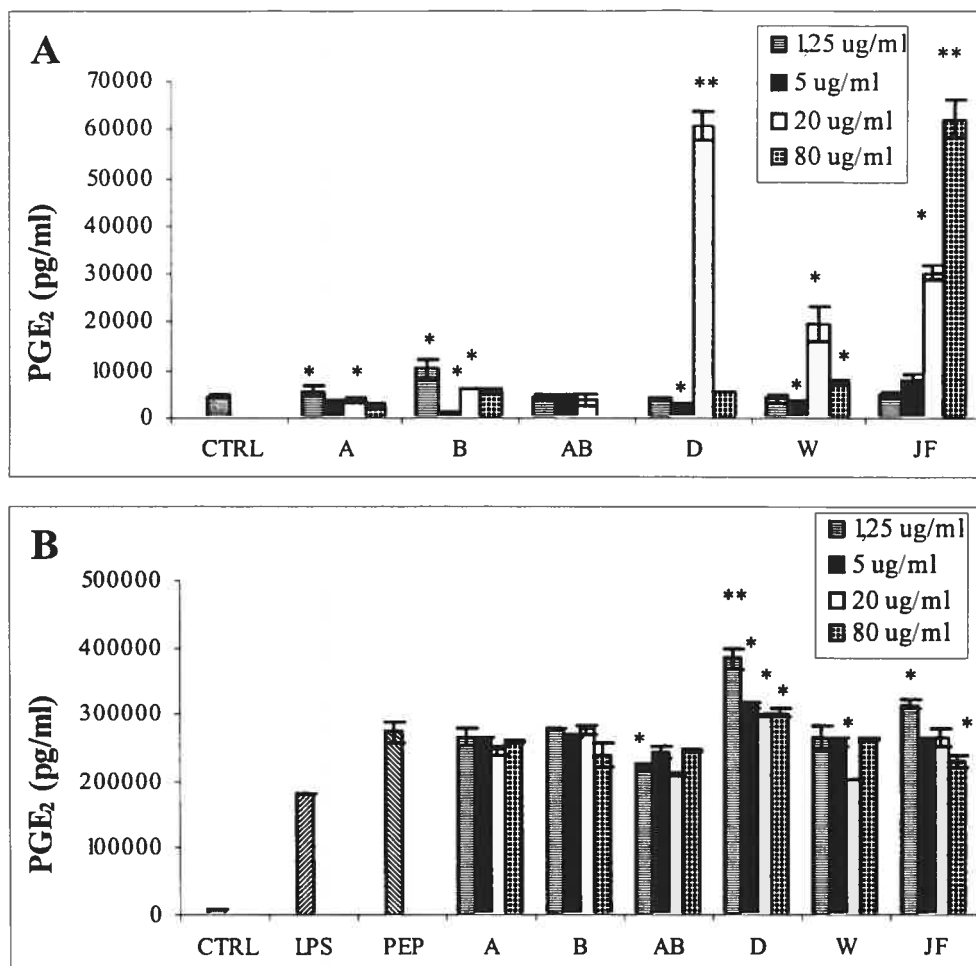


Figure 14: Production de PGE₂ par les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 non-stimulés (A) ou stimulés par le PEP (10 µg/ml) (B) en présence des différents dérivés de chitosane durant 24 hres. Les quantités de PGE₂ ont été mesurées par un test ELISA. Les expériences ont été réalisées en triplicata. Les niveaux de PGE₂ des macrophages traités avec les dérivés de chitosane ont été comparés à ceux des cellules contrôles (14A) ou activées avec le PEP (14B). (*p<0,05 **p<0,01)

de la réponse inflammatoire à titre de molécule anti-inflammatoire via l'augmentation de la réponse de type Th2. Cette substance a aussi été mesurée chez des macrophages péritonéaux non-activés ou activés par le PEP et traités avec les différents dérivés de chitosane. La figure 14A montre que la production de PGE₂ a été fortement augmentée par les produits D et JF à des concentrations de 20 et 80 µg/ml respectivement (p<0,01). De plus, l'induction de la production de PGE₂ par le produit JF est dépendante de la dose. Le produit W a aussi entraîné une augmentation de PGE₂ (p<0,05) surtout à la concentration de 20 µg/ml alors qu'à 5 µg/ml, le produit W a légèrement diminué la production de PGE₂. Les produits A et B (1,25 µg/ml) ont également faiblement augmenté la PGE₂ (p<0,05). Aucune stimulation de la PGE₂ n'a été mise en évidence avec les différentes concentrations du produit AB.

Dans un deuxième temps, afin de vérifier si les dérivés de chitosane pouvaient augmenter la production de PGE₂ par les macrophages déjà activés, des macrophages péritonéaux ont été stimulés par le PEP et traités avec les différentes concentrations des dérivés de chitosane. Tel que montré à la figure 14B, le LPS et le PEP ont bien entraîné la production de PGE₂ (p<0,01). A faible concentration, le produit D a augmenté la production de PGE₂ à des niveaux plus élevés que ceux obtenus avec le PEP (p<0,05 à 0,01). La plus faible concentration du produit JF a aussi fait augmenter légèrement la production de PGE₂ (p<0,05) induite par le PEP, alors qu'à une concentration plus élevée (80 µg/ml), la PGE₂ a été légèrement diminuée (p<0,05). La diminution de la PGE₂ a été également observée avec les produits AB et W à des concentrations de 1,25 et 20 µg/ml respectivement (p<0,05). Les produits A et B n'ont pas affecté la production de PGE₂ induite par le PEP et ce, à des concentrations variant de 1,25 à 80 µg/ml.

3.2.4- Détermination des voies de signalisation activées chez les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 par les dérivés de chitosane.

Le NF-κB et la p38MAPK sont des molécules impliquées dans des voies de signalisation intracellulaire modulant la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires. Dans le but de vérifier si la modulation des cytokines macrophagiques par les dérivés de chitosane, dans un contexte d'inflammation (i.e. chez des

macrophages activés par le PEP), implique l'activation ou l'inhibition de ces voies de signalisation, des macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 ont été activés par du PEP et traités avec les produits A, B, D et W à une concentration de 10 µg/ml pour une période de 24 heures. Les niveaux du NF-κB phosphorylés et de la p38MAPK ont été mesurés dans les lysats cellulaires à l'aide de tests ELISA. Les niveaux de NF-κB et de p38 étaient non-détectables chez des macrophages non-activés (résultats non-montrés). Les dérivés de chitosane utilisés dans cette expérience ont été sélectionnés en fonction d'intérêts précis provenant de la compagnie ISM Biopolymer Inc.

Tel que montré dans la figure 15A, l'activation des macrophages par le PEP s'accompagne d'une activation du NF-κB. Les dérivés de chitosane n'ont généralement pas eu d'effet sur la quantité de NF-κB mesurée dans les lysats de macrophages activés par le PEP, sauf le produit D ($p < 0,05$) qui a légèrement diminué le niveau de NF-κB.

Dans un second temps, la figure 15B montre l'effet des dérivés de chitosane sur les niveaux de p38 retrouvés dans les lysats de macrophages activés par le PEP. Ainsi, les produits n'ont pas eu d'effet sur le niveau intracellulaire de p38 à l'exception du produit B qui a entraîné une augmentation de la concentration de la p38 dans les cellules activées par le PEP ($p < 0,05$). Toutefois, cette augmentation demeure relativement faible.

3.2.5- Effets des dérivés de chitosane sur la production d'adipokines par les adipocytes de la région paramétriale des souris C57BL/6.

Les pré-adipocytes peuvent produire des adipokines pouvant influencer les voies de réponses immunes tout en étant impliqués dans la captation de la glucosamine. Dans le but de vérifier si le traitement des adipocytes avec les dérivés de chitosane s'accompagnait d'une modulation de la production d'adipokines ou de substances inflammatoires, ces cellules ont été extraites de la région paramétriale des souris C57BL/6. Les cellules ont été isolées par passage au travers d'un filtre de nylon et les cellules obtenues montraient des diamètres variant de 20 à 250 µm. La proportion de petits (10%) et de gros (90%) adipocytes variaient peu entre les souris. Les cellules ont été

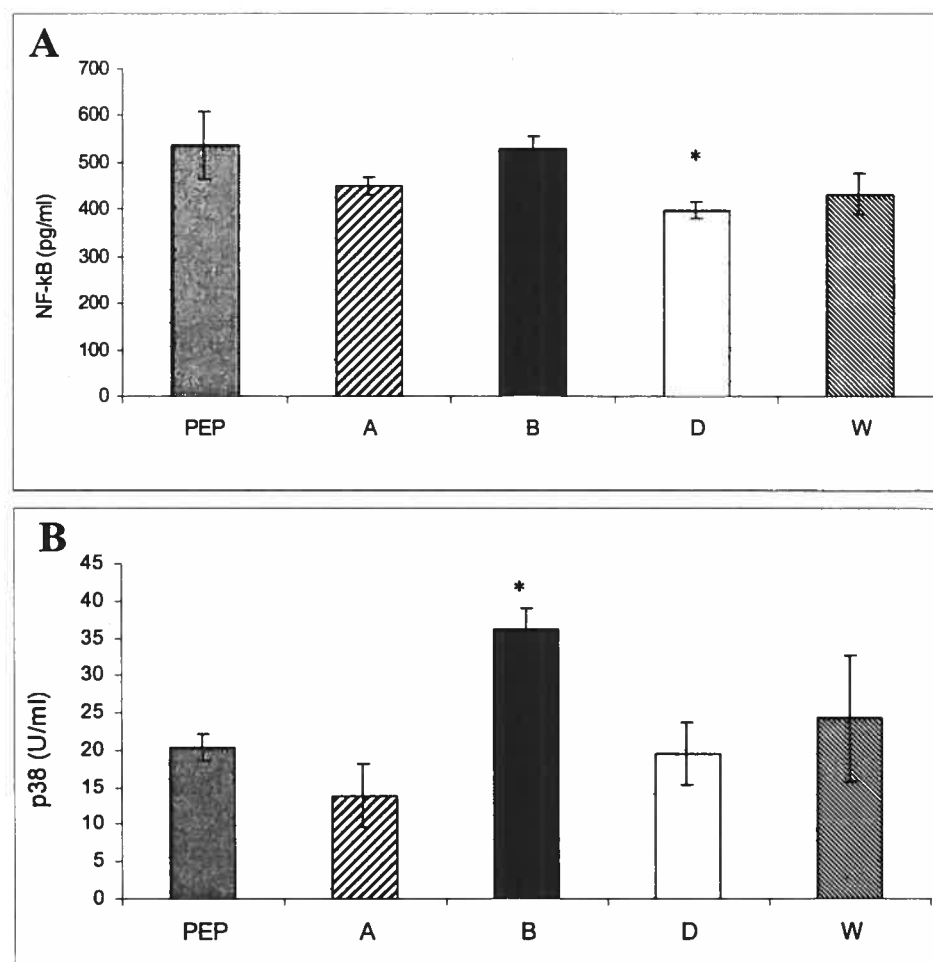


Figure 15: Dosage du NF- κ B (A) et de la p38 (B) dans les lysats cellulaires de macrophages péritonéaux C57BL/6 activés par le PEP (10 μ g/ml) et traités avec différents dérivés de chitosane à une concentration de 10 μ g/ml durant 24 hres. Les quantités de p38 et de NF- κ B ont été mesurées par des tests ELISA. Les expériences ont été réalisées en triplicata. (* $p < 0,05$)

traitées avec différentes concentrations des produits A, B, AB, D, W et JF pour une période de 24 heures. Un contrôle positif, le LPS, a été ajouté. Les cytokines adipocytaires, TNF- α , IL-1 β et IL-6 ainsi que la PGE₂ sécrétée dans les surnageants cellulaires ont été quantifiées par des tests ELISA.

La figure 16A montre la production de TNF- α par les adipocytes. Les adipocytes ont augmenté la production de TNF- α suite à leur stimulation par le LPS ($p < 0,05$). Les produits D et W à de fortes concentrations (80 et 160 $\mu\text{g/ml}$) ainsi que les produits A et B à des concentrations variant de 10 à 160 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,05$) ont augmenté la production de TNF- α à des niveaux supérieurs à ceux obtenus avec le LPS. Le produit AB n'a augmenté que très légèrement la production de TNF- α ($p < 0,05$) à la plus faible concentration testée ($p < 0,05$). Finalement, le produit JF (40 et 160 $\mu\text{g/ml}$) a augmenté faiblement la production de TNF- α .

D'autre part, la production d'IL-6 par les adipocytes a été modulée par les dérivés de chitosane. Les adipocytes ont augmenté leur production d'IL-6 suite à leur stimulation par le LPS ($p < 0,05$) (Fig. 16B). La plus faible concentration du produit A a entraîné la plus importante induction d'IL-6 pour atteindre un niveau largement supérieur à celui obtenu avec le LPS ($p < 0,01$). Les autres concentrations du produit A ont également augmenté la production d'IL-6 mais à des niveaux beaucoup moins importants ($p < 0,05$). Les produits AB et W, à des concentrations respectives de 1,25 et 80 $\mu\text{g/ml}$, ont amené également à une augmentation d'IL-6 dépassant celle atteinte par le LPS ($p < 0,05$). Les produits B et D ont stimulé plus faiblement la production d'IL-6 ($p < 0,05$) sauf à la concentration de 40 $\mu\text{g/ml}$.

Similairement, la production d'IL-1 β a été analysée. Tel que montré dans la figure 16C, le LPS n'a pas augmenté de façon significative la production d'IL-1 β chez les adipocytes sur une période de 24 heures. Par contre, le produit A (160 $\mu\text{g/ml}$) a stimulé la production de cette cytokine ($p < 0,05$), alors que les concentrations de 10 et 40 $\mu\text{g/ml}$ n'ont entraîné qu'une faible augmentation d'IL-1 β ($p < 0,05$). Les produits B, D et W ont également induit une faible quantité d'IL-1 β à des concentrations de 40, 80 et 160 $\mu\text{g/ml}$

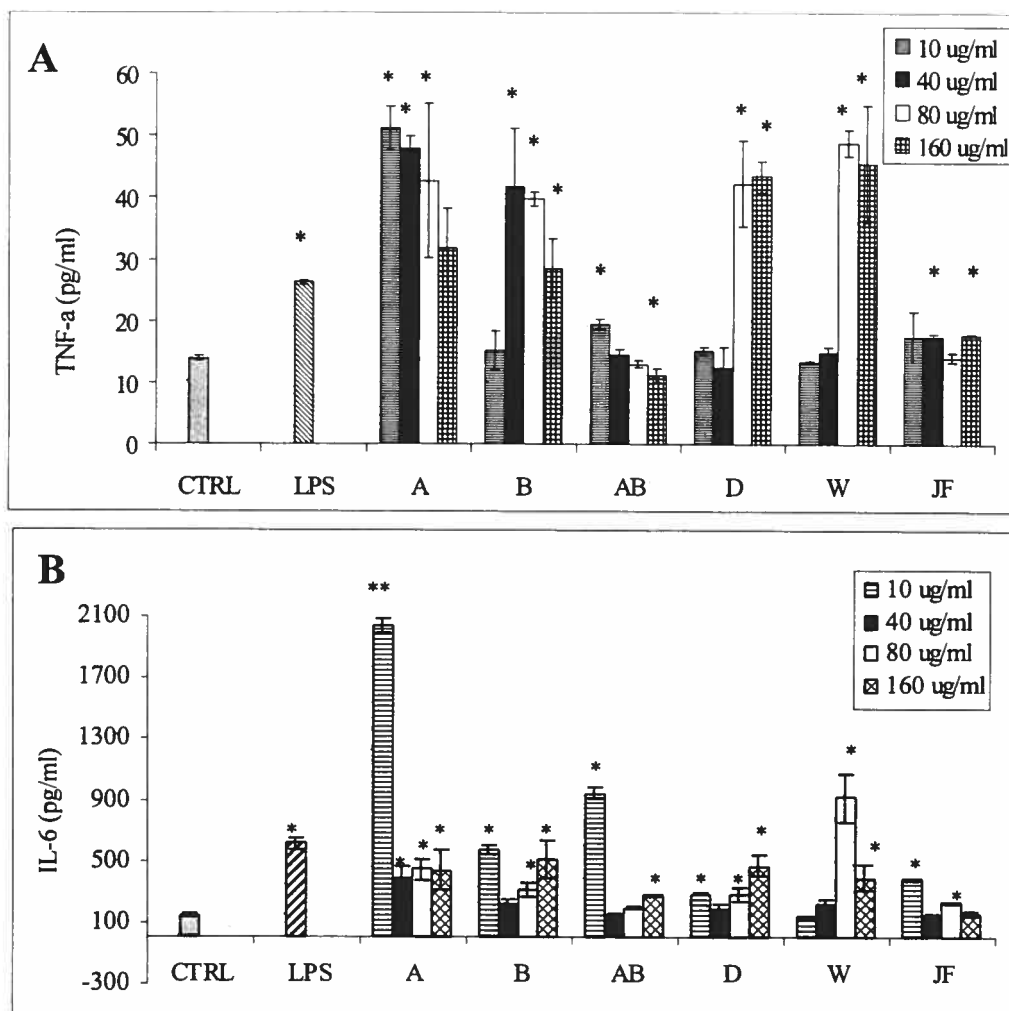


Figure 16: Production de TNF- α (A) d'IL-6 (B) d'IL-1 β (C) et de PGE₂ (D) par les adipocytes (région paramétriale) de souris C57BL/6 en présence de différents dérivés de chitosane durant 24 hres. Les concentrations de cytokines ont été mesurées par un test ELISA. Les expériences ont été réalisées en triplicata. (*p<0,05 **p<0,01)

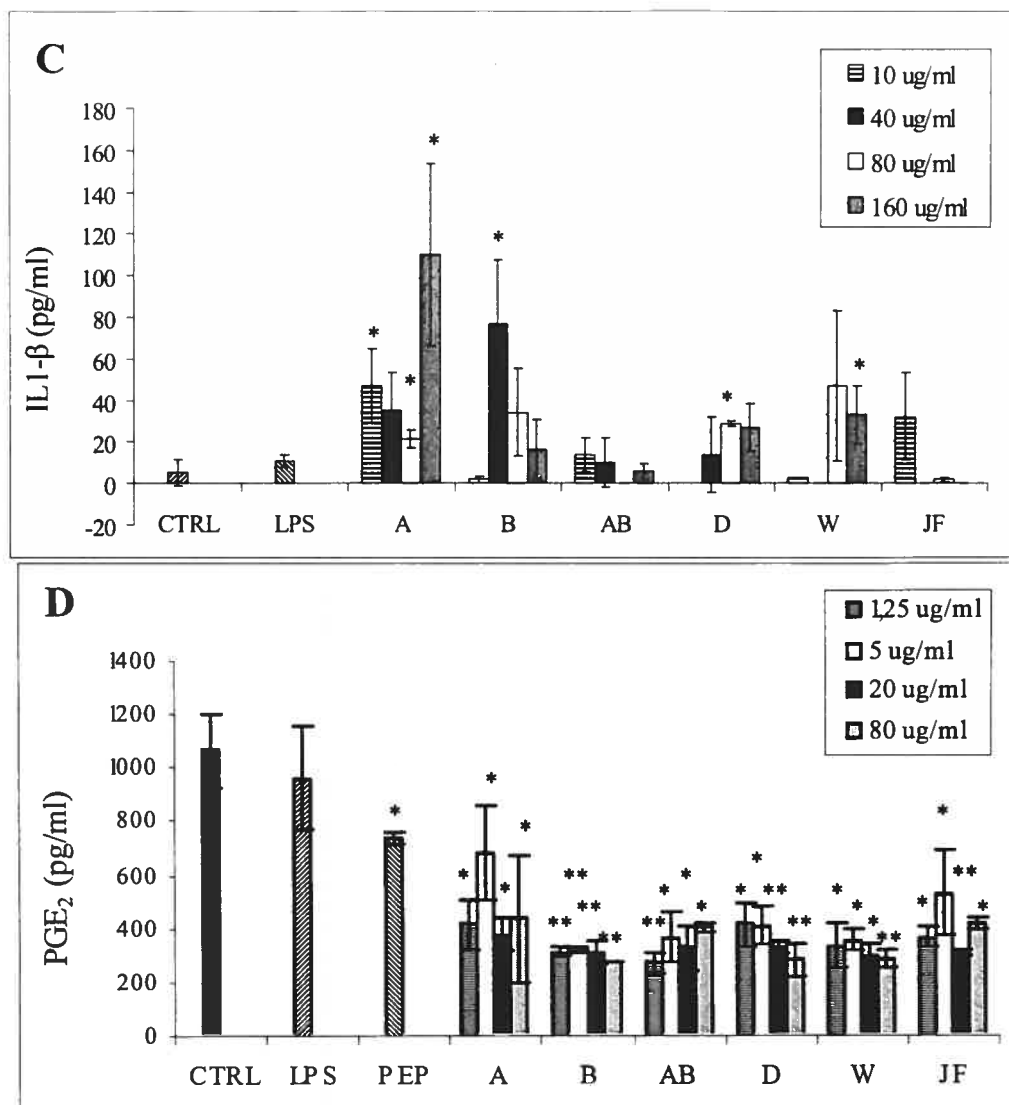


Figure 16 (suite): Production de TNF- α (A) d'IL-6 (B) d'IL-1 β (C) et de PGE₂ (D) par les adipocytes (région paramétriale) de souris C57BL/6 en présence de différents dérivés de chitosane durant 24 hres. Les concentrations de cytokines ont été mesurées par un test ELISA. Les expériences ont été réalisées en triplicata. (*p<0,05 **p<0,01)

respectivement ($p < 0,05$). Les produits AB et JF n'ont eu aucun effet sur la production d'IL-1 β , et ce à des concentrations variant de 10 à 160 $\mu\text{g/ml}$.

La PGE₂ est une substance produite fortement par les adipocytes. Tel que montré à la figure 16D, l'ajout de LPS n'a pas altéré la production basale de PGE₂ par les adipocytes alors que le PEP l'a légèrement diminuée ($p < 0,05$). Les dérivés de chitosane testés ont tous entraîné une inhibition de la PGE₂ produite par les adipocytes ($p < 0,05$ à 0,01). Par contre, les produits A et JF à la concentration de 5 $\mu\text{g/ml}$ ont le moins affecté le niveau de PGE₂. Le produit B a fortement diminué la production de PGE₂ quelque soit la concentration testée ($p < 0,01$).

3.2.6- Modulation de la production de leptine par les adipocytes des souris C57BL/6 traités avec les dérivés de chitosane.

Les cellules adipeuses produisent de la leptine qui agit à plusieurs niveaux sur le contrôle de l'appétit et sur le métabolisme du glucose. Elle stimule également les lymphocytes CD4 Th1 considérés comme lymphocytes pro-inflammatoires. Dans le but de vérifier si le traitement des adipocytes avec les dérivés de chitosane s'accompagnait d'une modulation de la production de leptine, ces cellules ont été extraites de la région paramétriale et traitées avec différentes concentrations des produits A, B, C et D pour une période de 24 heures. Des adipocytes ont aussi été traités avec le LPS et le PEP. La leptine sécrétée dans les surnageants cellulaires a été quantifiée par un test ELISA.

Tel que montré dans la figure 17A, les adipocytes ont faiblement augmenté leur production de leptine suite à leur stimulation par le LPS et le PEP ($p < 0,05$). Les dérivés de chitosane testés, quelque soit la concentration, ont tous entraîné des augmentations très faibles de leptine, à l'exception du produit C qui, à la plus forte concentration testée, n'a entraîné aucun effet sur la production de leptine par les adipocytes.

Afin de vérifier si l'activation préalable par le PEP pouvait favoriser une plus forte augmentation de leptine par les adipocytes en présence des dérivés de chitosane, les cellules ont été stimulées par le PEP et traitées avec les différentes concentrations des

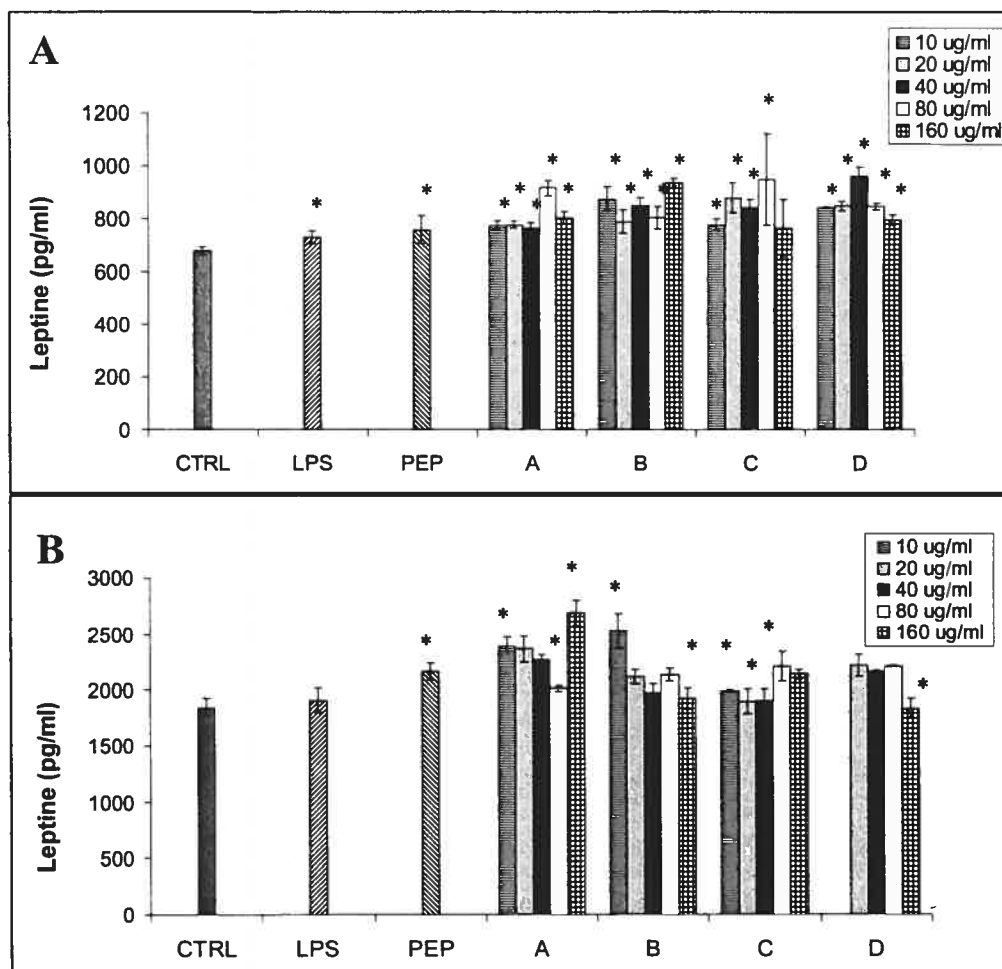


Figure 17: Production de leptine par les adipocytes (région paramétriale) de souris C57BL/6 en présence de surnageants de macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 non-stimulés (A) ou stimulés par le PEP (10  g/ml) (B) en présence des différents dérivés de chitosane durant 24 hres. Les quantités de leptine ont été mesurées par un test ELISA. Les expériences ont été réalisées en triplicata. Les niveaux de leptine des macrophages traités avec les dérivés de chitosane ont été comparés à ceux des cellules contrôles (17A) ou activées avec le PEP (17B). Dans les deux cas (A et B) les contrôles cellulaires ne contiennent que des macrophages non-stimulés. (*p<0,05)

dérivés de chitosane. Tel que montré à la figure 17B, le PEP seul a bien stimulé la production de leptine ($p < 0,05$). Le produit A a entraîné une stimulation supérieure à celle induite par le PEP lorsque les cellules étaient préalablement activées par le PEP, et ce, surtout à la concentration de 160 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,05$). La plus faible et la plus forte concentration du produit A n'a fait augmenter que légèrement la production de leptine alors que seule la concentration de 1,25 $\mu\text{g/ml}$ du produit B a eu cet effet ($p < 0,05$). Par contre, le produit A à une concentration de 80 $\mu\text{g/ml}$, le produit C à une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ et les produits B et D à une concentration de 160 $\mu\text{g/ml}$ ont plutôt inhibé très faiblement la production de leptine ($p < 0,05$), alors que les autres concentrations n'ont eu aucun effet additif ou suppressif sur la production de leptine par les adipocytes stimulés par le PEP.

3.3- Effets *in vitro* des dérivés de chitosane de haut PM sur les splénocytes dans un modèle aviaire.

Il a été montré que le chitosane possède des propriétés immunostimulatrices (Porporatto *et al.*, 2004 ; Yu *et al.*, 2004). Il est possible que certains dérivés puissent être utilisés comme immunostimulants par voie orale dans le but de diminuer ou de protéger des jeunes oiseaux contre des maladies gastro-intestinales importantes en médecine aviaire. Nous avons voulu vérifier si les dérivés de chitosane produits par ISM Biopolymer Inc. pouvaient exprimer des propriétés immunostimulantes.

3.3.1- Effets *in vitro* des oligomères de chitosane de haut PM sur la transformation blastique dans un modèle aviaire.

3.3.1.1- Poussins sans agents pathogènes spécifiques (SPF) âgés de 7 jours

Afin de vérifier l'effet stimulateur des dérivés de chitosane de haut PM sur l'activité métabolique des lymphocytes, des splénocytes de poussins exempts d'agents pathogènes spécifiques (SPF) de 7 jours d'âge ont été mis en culture durant 24 heures en présence des différentes concentrations de dérivés de chitosane W (OligoviaTM), du produit G correspondant à de la GlcNAc, des produits 12R et 18R et des produits

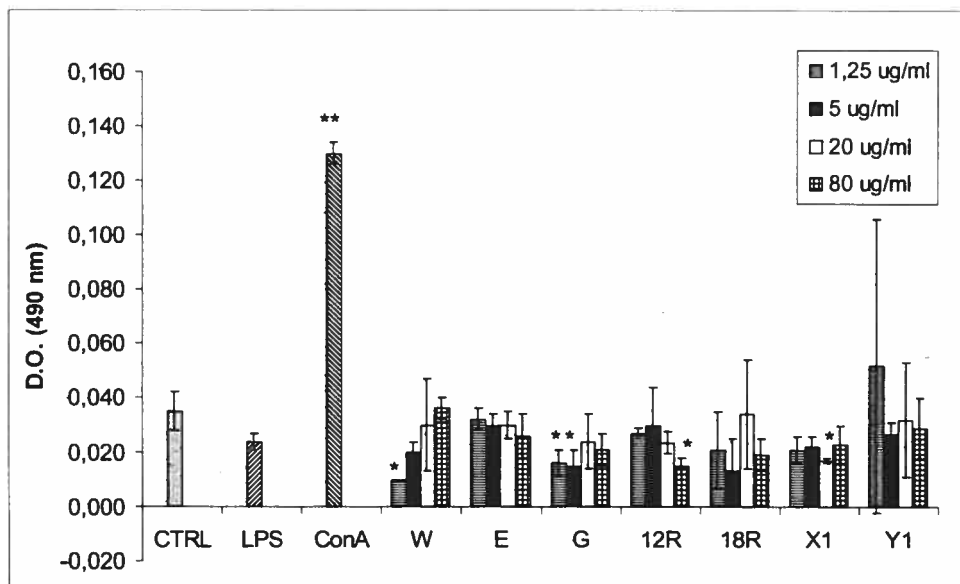


Figure 18: Activité métabolique des lymphocytes spléniques de poussins SPF âgés de 7 jours par différents dérivés de chitosane de haut PM durant 24 hrs. L'activité des lymphocytes a été évaluée par un test MTS-PMS. Les expériences ont été réalisées en triplicata. (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$)

complexes X1, Y1 et E. Des contrôles activateurs tels que le LPS (macrophages) et la concanavoline A (Con A) (lymphocytes) ont été utilisés. L'activité métabolique des splénocytes a été mise en évidence par le test MTS-PMS. La figure 18 montre que la Con A a augmenté l'activité métabolique des lymphocytes spléniques ($p < 0,01$). La plupart des dérivés de chitosane n'ont pas eu d'effet sur l'activité des splénocytes, sauf le produit W qui a entraîné une légère inhibition à la plus faible concentration étudiée ($p < 0,05$), ainsi que le produit G à des concentrations de 1,25 et 5 $\mu\text{g/ml}$, le produit 12R à la plus forte concentration, et le produit X1 à une concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,05$).

3.3.1.2- Poussins SPF âgés de 14 jours

A cause de l'immaturation immunologique des jeunes poussins et de la faible réactivité des lymphocytes avant 14 jours d'âge, les effets des dérivés de chitosane de haut PM sur la transformation blastique ont été testés avec des splénocytes de poussins SPF plus âgés. Tel que montré dans la figure 19A, l'activité métabolique des splénocytes a augmenté suite à leur stimulation par la Con A ($p < 0,01$). La plupart des produits testés ont légèrement augmenté l'activité métabolique des splénocytes de façon comparable à l'exception du produit Y1 qui n'a eu aucun effet sur l'activité lymphocytaire. Par contre, ces stimulations sont demeurées inférieures à celle induite par la Con A.

Compte tenu de la présence de macrophages nécessaire à la réponse des lymphocytes dans la préparation de splénocytes, les niveaux de stimulation induits par les différents produits ont été vérifiés sur des splénocytes en présence de LPS. Les résultats ont montré que l'ajout de LPS n'a pas augmenté les niveaux de stimulation (Fig. 19B). Les cellules stimulées uniquement par le LPS n'ont pas montré une augmentation de leur activité métabolique. De plus, seuls les produits W, E, 18R et Y1 ont eu un effet stimulateur à des concentrations de 80, 5, 1,25, et 5 $\mu\text{g/ml}$ respectivement ($p < 0,05$) mais à des niveaux inférieurs à celui atteint par la Con A ($p < 0,05$). Les autres produits et les autres concentrations n'ont pas stimulé ou inhibé l'activité des splénocytes. Par contre, l'ajout de LPS a plutôt diminué les niveaux de stimulation des lymphocytes en présence des dérivés de chitosane lorsque l'on compare les résultats entre les sections A et B de la figure 19.

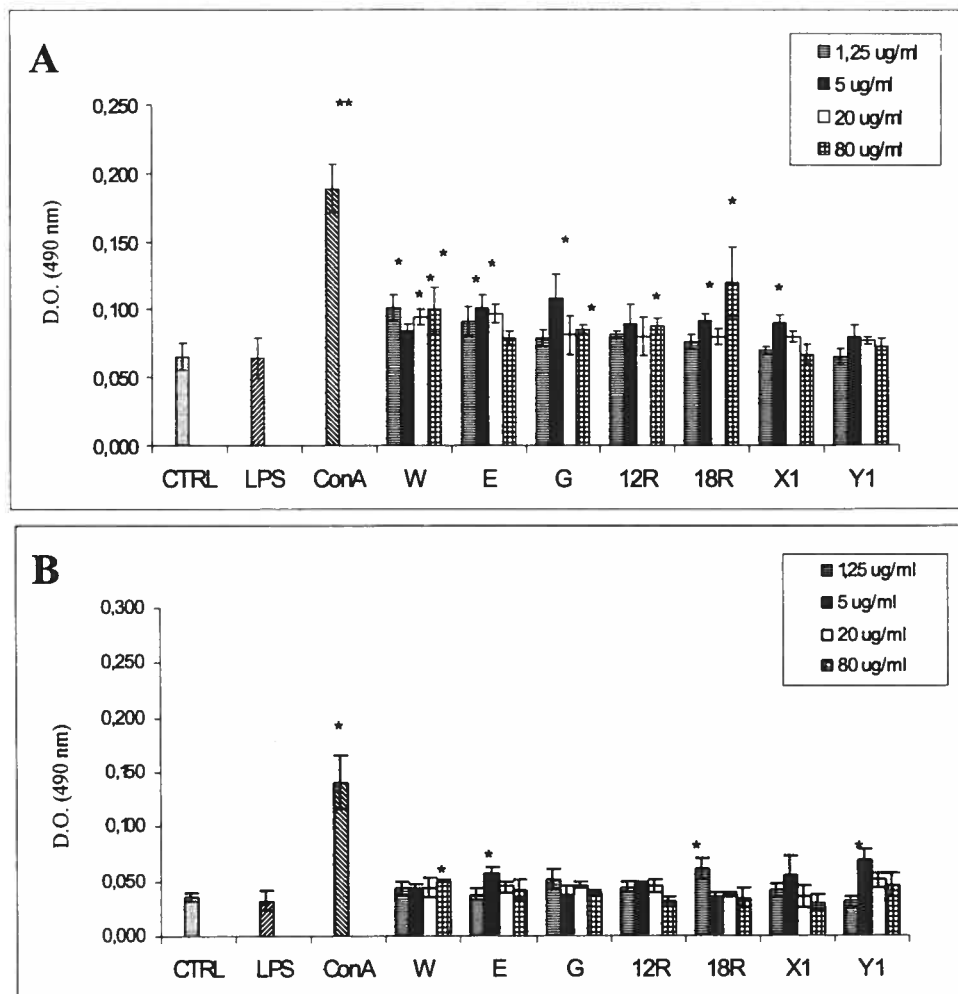


Figure 19: Activité métabolique des lymphocytes spléniques de poussins SPF âgés de 14 jours en absence (A) ou en présence (B) de LPS (0,5 µg/ml) et traités avec différents dérivés de chitosane de haut PM durant 24 hrs. L'activité des lymphocytes a été évaluée par un test MTS-PMS. Les expériences ont été réalisées en triplicata. (*p<0,05 **p<0,01)

Il est possible que la faible concentration de macrophages dans les préparations de splénocytes n'ait pas permis de bien discriminer les effets immunostimulants des différents produits de haut PM. Ainsi, les macrophages spléniques de poussins de 14 jours ont été isolés par adhérence au plastique et traités durant 24 heures avec les différents produits. Les surnageants de ces cellules ont été utilisés comme milieux conditionnés et ont été ajoutés à des splénocytes en culture. Les niveaux de stimulation blastique ont alors été évalués. Tel que montré à la figure 20, la Con A a bien augmenté l'activité métabolique des splénocytes ($p < 0,05$). Toutefois, le produit G, le produit X1 à la plus faible concentration testée et le produit Y1 à 20 et 80 $\mu\text{g/ml}$ ont plutôt entraîné un effet inhibiteur sur l'activité métabolique des splénocytes ($p < 0,05$). Aucun effet n'a été observé avec des surnageants de macrophages activés par les autres produits et le LPS.

Dans un second temps, les macrophages ont été incubés avec du LPS et les différents produits durant 24 heures. Les surnageants ont été prélevés après 24 heures et mis en contact avec des splénocytes. Les résultats ont montré que l'addition de LPS n'a entraîné aucun effet stimulant ou inhibiteur de l'activité des lymphocytes quelque soit le produit utilisé (résultats non montrés).

3.3.1.3- Poulets adultes

Afin de vérifier si le niveau de développement du système immunitaire pouvait influencer la réponse des cellules aux dérivés de chitosane de haut PM, des splénocytes de poulets adultes, i.e. présentant un système immunitaire complètement développé, ont alors été utilisés. Tel que montré à la figure 21, la Con A a bien augmenté l'activité des splénocytes ($p < 0,01$). Les produits W et E, quelque soit la concentration, ont entraîné une stimulation de l'activité métabolique des splénocytes ($p < 0,05$) sans toutefois dépasser le niveau atteint par la Con A. Le produit 12R a aussi augmenté l'activité des cellules mais de façon moins importante ($p < 0,05$), sauf à la concentration de 80 $\mu\text{g/ml}$. Seules les concentrations 1,25 et 80 $\mu\text{g/ml}$ ont eu cet effet avec le produit 18R ($p < 0,05$). Aucun effet n'a été observé avec les produits G, X1 et Y1.

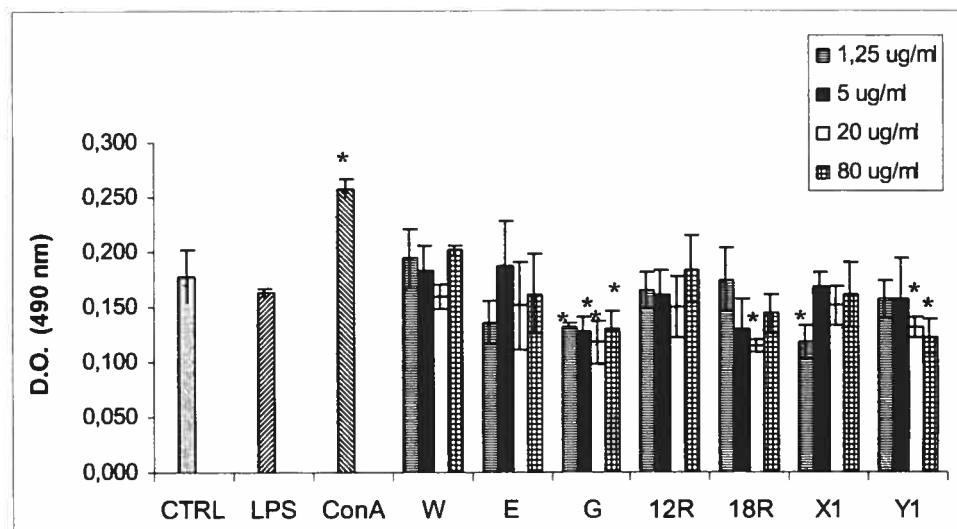


Figure 20: Activité métabolique des lymphocytes spléniques de poussins SPF âgés de 14 jours mis en contact durant 48 hres avec des surnageants de macrophages spléniques traités avec les dérivés de chitosane de haut PM durant 24 hres. L'activité des lymphocytes a été évaluée par un test MTS-PMS. Les expériences ont été réalisées en triplicata. (* $p < 0,05$)

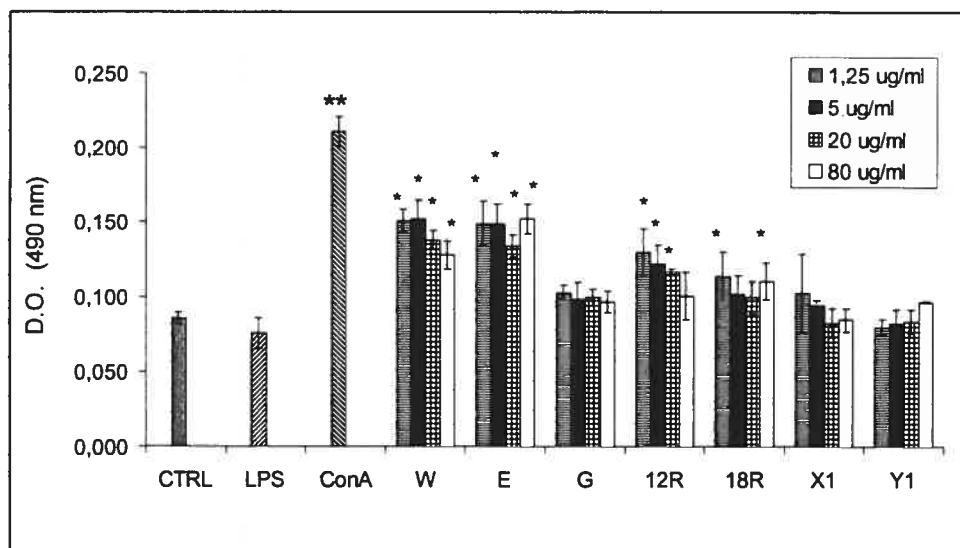


Figure 21: Activité métabolique des splénocytes de poulets adultes traités avec différents dérivés de chitosane de haut PM durant 24 hres. L'activité des lymphocytes a été évaluée par un test MTS-PMS. Les expériences ont été réalisées en triplicata. (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$)

3.3.2- Analyse des sous-populations lymphocytaires spléniques.

L'augmentation ou la diminution de l'activité métabolique des lymphocytes peut se refléter par des changements phénotypiques dans les sous-populations lymphocytaires impliquées dans les réponses immunes innée, cellulaire ou humorale.

3.3.2.1- Analyse phénotypique des différentes sous-populations lymphocytaires CD3/CD8 et CD4/CD8 de la rate de poussins SPF âgés de 14 jours traités *in vitro* avec différents dérivés de chitosane de haut PM.

3.3.2.1.1- Lymphocytes non-activés

Des splénocytes de poussins SPF de 14 jours d'âge ont été isolés et traités durant 48 heures avec les différents dérivés de chitosane. Les cellules ont alors été marquées à l'aide d'anticorps anti-CD4 (FITC) et anti-CD8 (PE) de poulet et analysées en cytofluorométrie.

La figure 22 montre des exemples d'analyses multiparamétriques des splénocytes de poussins non-stimulés (Fig. 22A), stimulés par la Con A (Fig. 22B) ou par le produit W (Fig. 22C). Les cellules CD4+CD8- représentent 29,1% des splénocytes alors que les cellules CD4-CD8+ sont à 16,98 %. La population de cellules CD4+CD8+ est présente normalement dans la rate de poussins et atteint 11,38%. Suite à la stimulation par la Con A, la plupart des cellules ont montré soit un phénotype CD4+CD8- (40,57%) ou CD4-CD8+ (17,58%). Le produit W a donné des résultats intermédiaires où seules les cellules CD4+CD8- ont augmentées à 39,18%. Les lymphocytes CD4+CD8+ n'ont pas été stimulés. De façon comparable, les splénocytes ont aussi été marqués par des anticorps anti-CD3 (FITC) et anti-CD8 (PE) de poulets afin de discriminer les cellules de type NK qui sont CD3-CD8+.

L'analyse des résultats des deux doubles immunomarquages réalisés en triplicata est présentée dans la figure 23 pour chaque produit à deux concentrations différentes, soit 1,25 et 80 µg/ml. Cette figure montre les pourcentages des sous-populations de

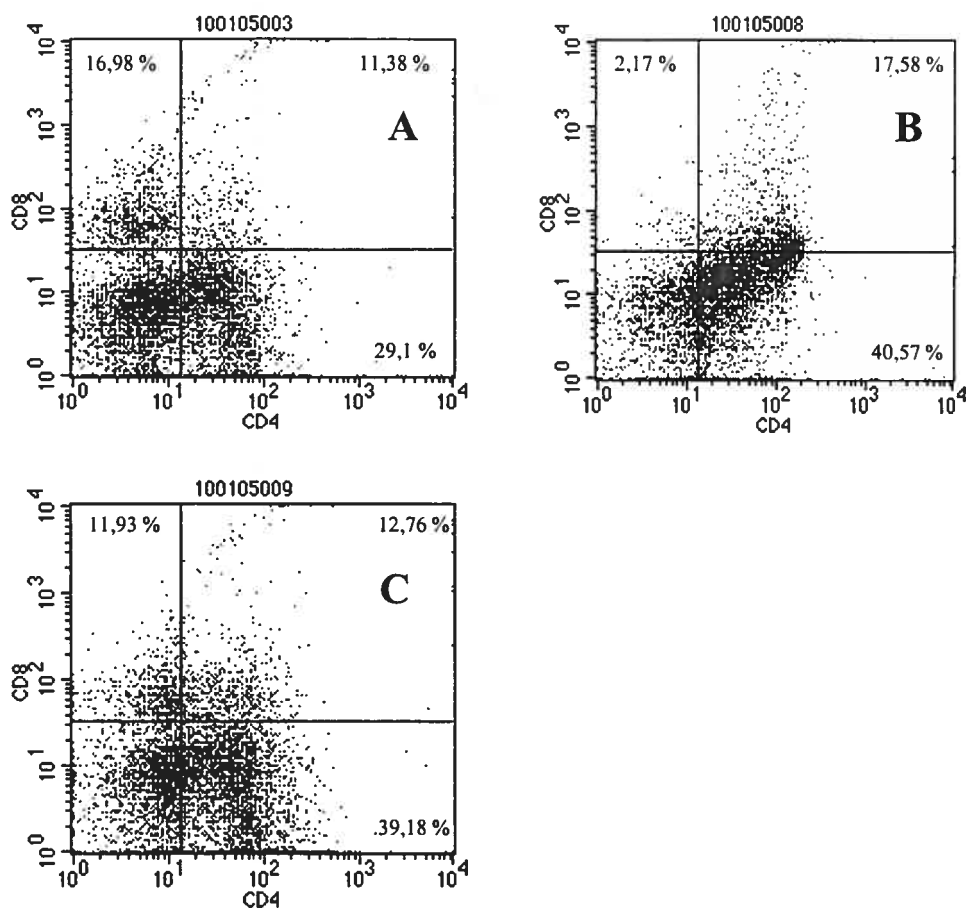


Figure 22: Analyse phénotypique des sous-populations CD4/CD8 de la rate de poussins SPF âgés de 14 jours non-stimulées (A), stimulées par la ConA (50 $\mu\text{g/ml}$) (B) et traitées avec le produit W (80 $\mu\text{g/ml}$) (C) durant 24 hres. Les analyses cytofluorométriques ont été effectuées par un double immunomarquage à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-CD4-FITC et anti-CD8-PE.

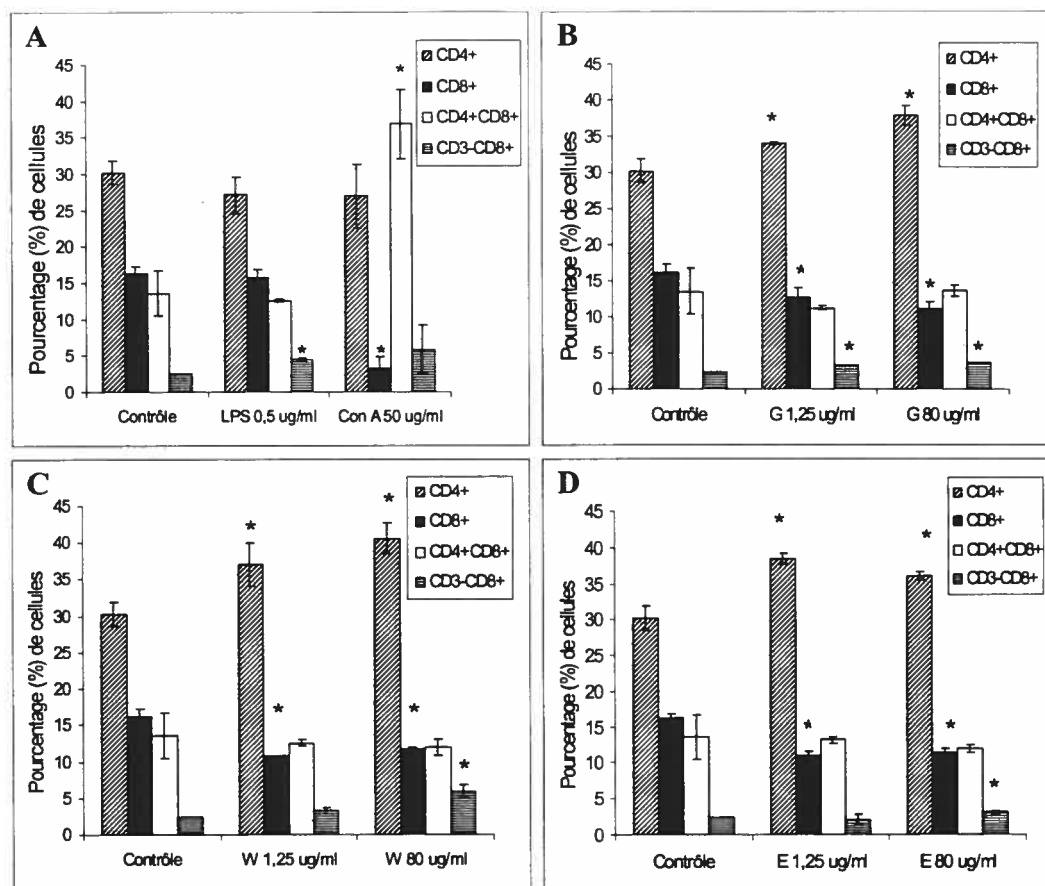


Figure 23: Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 et CD3/CD8 spléniques de poussins SPF âgés de 14 jours traitées avec du LPS (0,5 µg/ml) ou de la ConA (50 µg/ml) (A), ou avec différents dérivés de chitosane (B = produit G ; C = produit W ; D = produit E ; E = produit 12R ; F = produit 18R ; G = produit X1 ; H = produit Y1) pendant 24 heures. Les analyses cytofluorométriques ont été effectuées par un double immunomarquage à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE et anti-CD3-FITC. Les expériences ont été réalisées en triplicata. (*p<0,05)

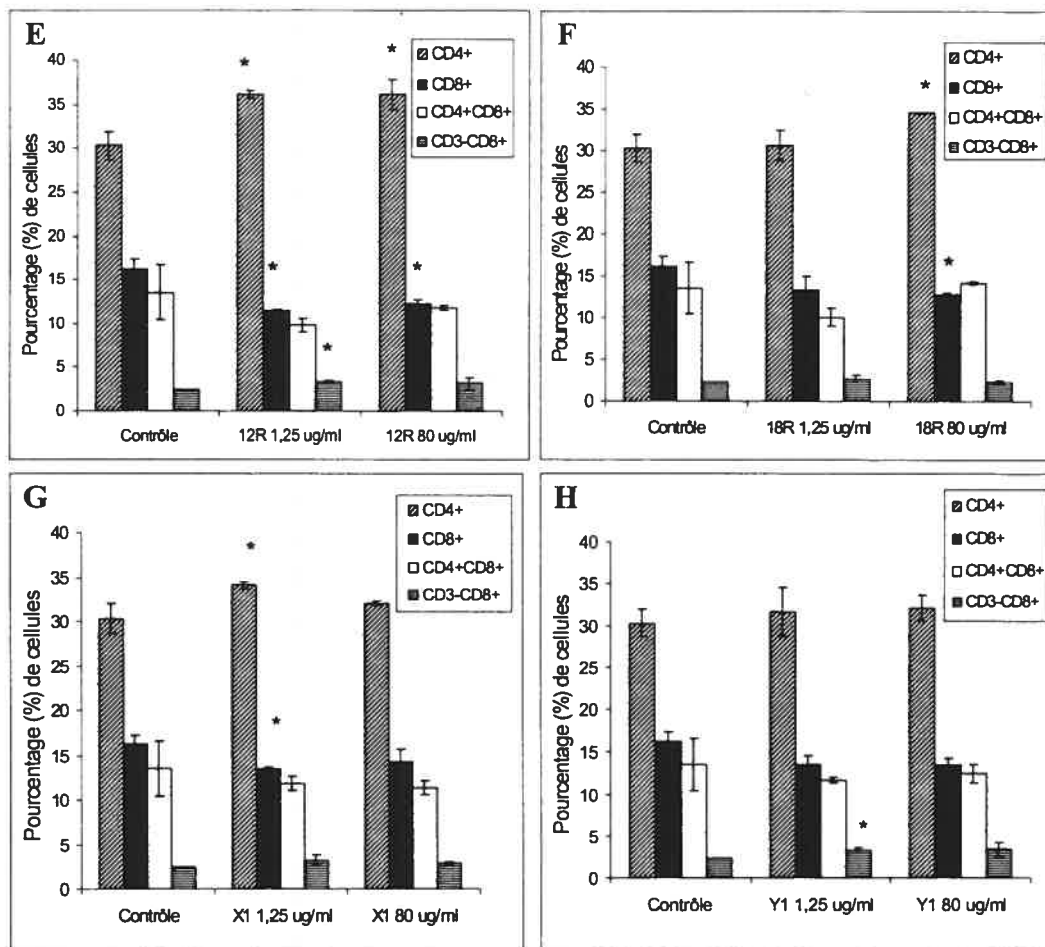


Figure 23 (suite): Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 et CD3/CD8 spléniques de poussins SPF âgés de 14 jours traités avec du LPS (0,5 µg/ml) ou de la ConA (50 µg/ml) (A), ou avec différents dérivés de chitosane (B = produit G ; C = produit W ; D = produit E ; E = produit 12R ; F = produit 18R ; G = produit X1 ; H = produit Y1) pendant 24 heures. Les analyses cytofluorométriques ont été effectuées par un double immunomarquage à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE et anti-CD3-FITC. Les expériences ont été réalisées en triplicata. (*p<0,05)

lymphocytes T CD4+ (CD4+CD8-), T CD8+ (CD4-CD8+), T double-positifs (CD4-CD8+) et des cellules NK (CD3-CD8+) suite à une stimulation antigénique (LPS et Con A) ou un traitement avec les oligomères de chitosane. Dans la figure 23A, l'ajout de LPS directement sur les splénocytes a induit une légère augmentation des cellules NK ($p < 0,05$) alors que la Con A a favorisé l'activation des lymphocytes CD4+CD8+ au détriment des CD4-CD8+ ($p < 0,05$). Les produits G, W et E ont favorisé l'augmentation de CD4+CD8- et une diminution de CD4-CD8+ sans affecter les CD4+CD8+ et ce, aux deux concentrations étudiées (Figs. 23B, C, D). Similairement, l'oligomère 12R a aussi montré les mêmes effets (Fig. 23E) alors que seule la concentration la plus élevée de l'oligomère 18 R a eu un effet sur les CD4+CD8- et CD4-CD8+ ($p < 0,05$) (Fig. 23F). Le produit complexe X1 a aussi montré une capacité à augmenter les CD4+CD8+ mais à faible concentration seulement ($p < 0,05$) (Fig. 23G). L'augmentation des cellules NK a été observée avec les produits W, E et G mais à la plus forte concentration seulement (80 $\mu\text{g/ml}$), ainsi qu'avec le produit Y1 à faible concentration ($p < 0,05$) (Fig. 23H).

3.3.2.1.2- Lymphocytes en présence de LPS

Dans un deuxième temps, nous avons vérifié si les dérivés de chitosane de haut PM pouvaient altérer l'équilibre des populations lymphocytaires en présence de LPS. Cette hypothèse a été testée avec des splénocytes de poussins âgés de 14 jours traités *in vitro* avec les différents dérivés de chitosane. Pour ce faire, des splénocytes de poussins SPF 14 jours ont été mis en culture en présence de LPS (0,5 $\mu\text{g/ml}$) et des différents oligomères de chitosane (1,25 et 80 $\mu\text{g/ml}$) et les doubles immunomarquages décrits précédemment ont été réalisés.

La figure 24 montre les pourcentages des différentes sous-populations en présence de LPS et des différents produits. En présence de LPS, les dérivés de chitosane de haut PM modifient les rapports entre les sous-populations lymphocytaires. Ainsi, le produit W à la forte concentration seulement a augmenté les CD4+CD8- et les CD4+CD8+ ($p < 0,05$) (Fig. 24A). Le produit E a, au contraire, diminué les CD4+CD8-, à la plus forte concentration en présence de LPS ($p < 0,05$) (Fig. 24B). Les produits G et 12R ont

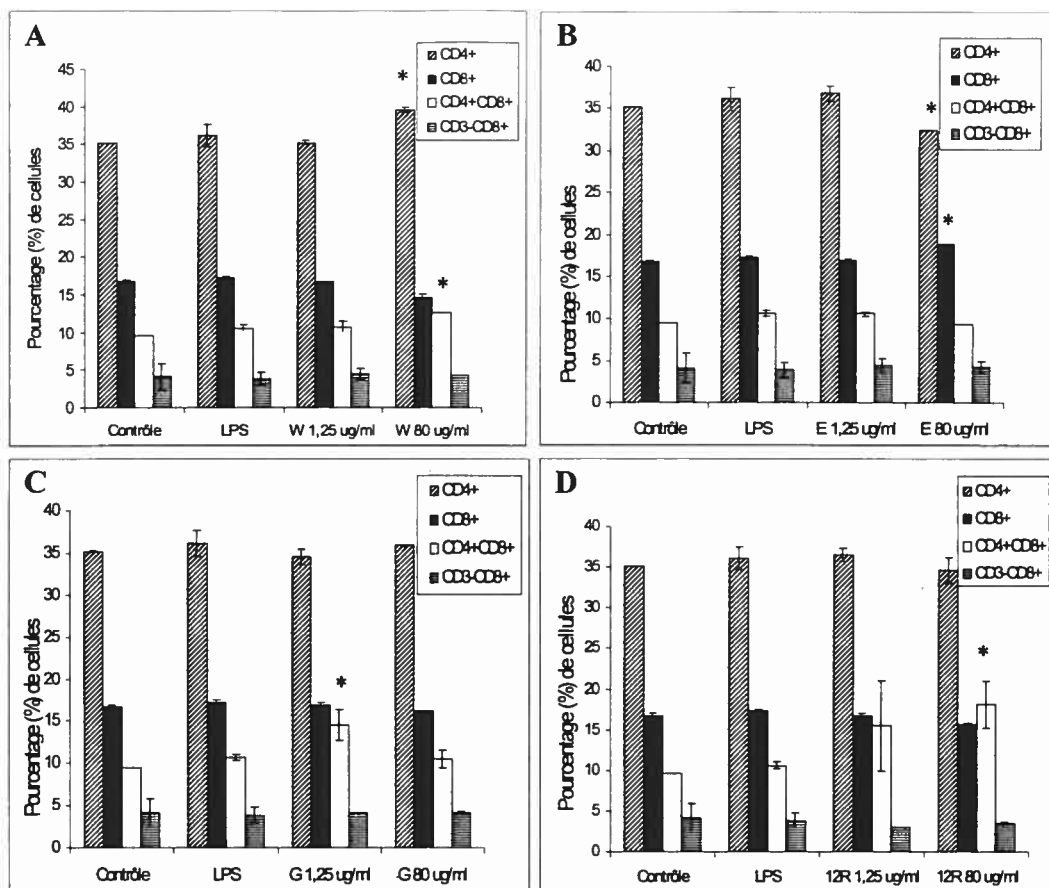


Figure 24: Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 et CD3/CD8 spléniques de poussins SPF âgés de 14 jours stimulées préalablement avec du LPS (0,5 µg/ml) et traitées avec différents dérivés de chitosane (A = produit W ; B = produit E ; C = produit G ; D = produit 12R ; E = produit 18R ; F = produit X1 ; G = produit Y1) pendant 24 heures. Les analyses cytofluorométriques ont été effectuées par un double immunomarquage à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE et anti-CD3-FITC. Les expériences ont été réalisées en triplicata. (* $p < 0,05$)

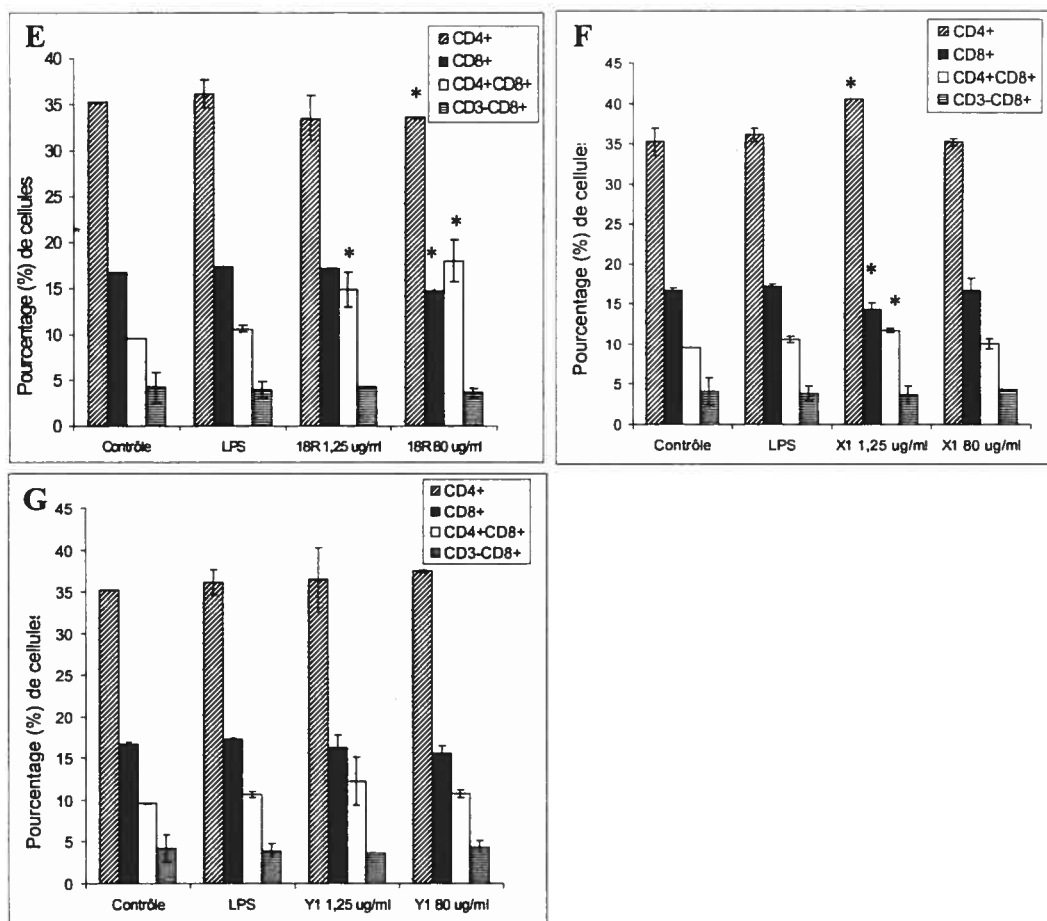


Figure 24 (suite): Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 et CD3/CD8 spléniques de poussins SPF âgés de 14 jours stimulés préalablement avec du LPS (0,5 µg/ml) et traités avec différents dérivés de chitosane (A = produit W ; B = produit E ; C = produit G ; D = produit 12R ; E = produit 18R ; F = produit X1 ; G = produit Y1) pendant 24 hrs. Les analyses cytofluorométriques ont été effectuées par un double immunomarquage à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE et anti-CD3-FITC. Les expériences ont été réalisées en triplicata. (*p<0,05)

augmenté les CD4+CD8+, respectivement à la plus faible et à la plus forte concentration ($p < 0,05$) (Figs. 24C et D). Le produit 18R a aussi favorisé l'augmentation des CD4+CD8+ aux deux concentrations étudiées mais au détriment des CD4+CD8- et des CD4-CD8+ avec la plus haute concentration seulement ($p < 0,05$) (Fig. 24E). Le produit complexe X1 a eu peu d'effet sauf celui d'augmenter les pourcentages relatifs des CD4+CD8- et les CD4+CD8+ au détriment des CD4-CD8+ pour la plus faible concentration du produit X1 ($p < 0,05$) (Fig. 24F). Aucun effet n'a été observé avec le produit Y1.

3.3.2.2- Analyse phénotypique des différentes sous-populations lymphocytaires IgM/TCR $\gamma\delta$ de la rate de poussins SPF âgés de 14 jours traités *in vitro* avec différents dérivés de chitosane de haut PM.

Des expériences similaires à celles décrites dans la section précédente ont été réalisées mais cette fois, les lymphocytes B ont été marqués à l'aide d'anticorps anti-IgM (FITC) de poulet alors que les lymphocytes exprimant les TCR $\gamma\delta$ ont été marqués avec un anticorps anti-TCR $\gamma\delta$ (PE).

Le double immunomarquage IgM/TCR $\gamma\delta$ des cellules traitées avec les différents produits n'a mis en évidence aucune variation dans les populations de lymphocytes B ou de lymphocytes TCR $\gamma\delta$ (résultats non montrés).

Similairement, ces expériences ont aussi été réalisées sur des splénocytes mis en contact avec des surnageants de macrophages traités pendant 24 heures avec les différents dérivés de chitosane. Les immunomarquages décrits dans les deux sections précédentes ont été effectués de façon à phénotyper toutes les populations lymphocytaires. Aucune variation significative n'a été mise en évidence et ce, pour tous les produits testés (résultats non-montrés).

3.3.2.3- Analyse phénotypique des différentes sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 de la rate de poulets adultes traités *in vitro* avec différents dérivés de chitosane de haut PM.

A cause de la plus faible réactivité des lymphocytes de poussins SPF âgés de 7 et 14 jours, les effets des différents dérivés de chitosane sur les populations lymphocytaires ont été vérifiés avec des splénocytes de poulets adultes. La figure 25 permet de constater, qu'au contraire de ce qui avait été observé avec les lymphocytes de poussins 14 jours, les dérivés de chitosane diminuent *in vitro* les populations de lymphocytes T CD4+CD8- et augmentent les cellules CD4-CD8+ lorsque les lymphocytes proviennent de poulets adultes. Ainsi, le produit W, à forte concentration seulement, a modifié légèrement les pourcentages des lymphocytes CD4+CD8- et CD4-CD8+ ($p < 0,05$) (Fig. 25A). Par contre, le produit E a favorisé l'augmentation des cellules CD4-CD8+ et CD4+CD8+ à la plus faible concentration seulement ($p < 0,05$) (Fig. 25B). Cette augmentation de CD4-CD8+ au détriment des CD4+CD8- a aussi été observée avec les produits G et 12R quelque soit la concentration utilisée ($p < 0,05$) (Figs. 25C et D) alors que le produit 18R a fortement augmenté les lymphocytes CD4-CD8+ et CD4+CD8+ ($p < 0,05$ et $0,01$) (Fig. 25E). Les produits complexes X1 et Y1 n'ont eu pratiquement pas d'effet. D'autre part, aucun des produits n'a modifié les pourcentages des lymphocytes B, des lymphocytes TCR $\gamma\delta$ ou des cellules NK (CD3-CD8+) (résultats non-montrés).

3.3.3- Production de cytokines par les lymphocytes spléniques en réponse aux dérivés de chitosane de haut PM.

Les modifications dans les sous-populations lymphocytaires induites par les différents dérivés de chitosane indiquent que ces produits modifient l'équilibre CD4/CD8 sans affecter les lymphocytes B ou les TCR $\gamma\delta$, ce qui suggère des changements dans les voies immunitaires dépendantes des lymphocytes CD4+.

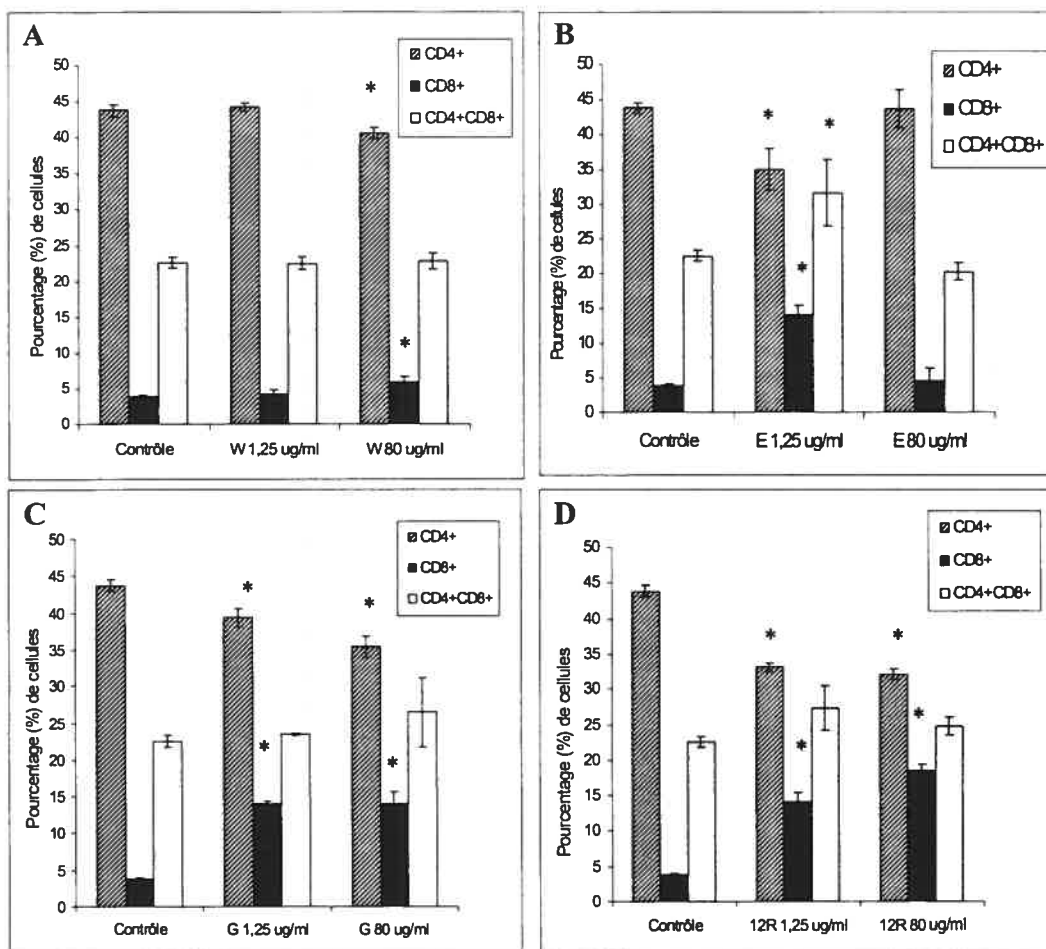


Figure 25: Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 spléniques de poulets adultes traités avec différents dérivés de chitosane (A = produit W ; B = produit E ; C = produit G ; D = produit 12R ; E = produit 18R ; F = produit X1 ; G = produit Y1) pendant 24 hres. Les analyses cytofluorométriques ont été effectuées par un double immunomarquage à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-CD4-FITC et anti-CD8-PE. Les expériences ont été réalisées en triplicata. (* $p < 0,05$)

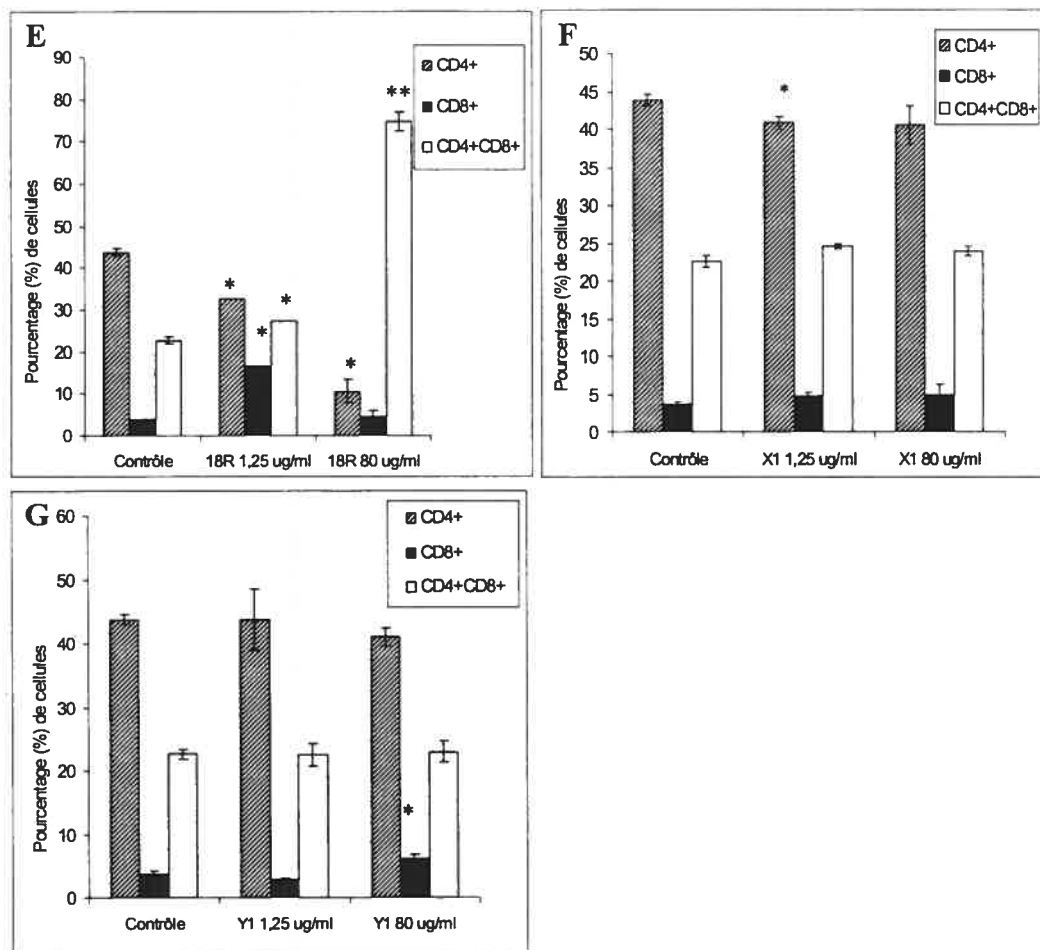


Figure 25 (suite): Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 spléniques de poulets adultes traités avec différents dérivés de chitosane (A = produit W ; B = produit E ; C = produit G ; D = produit 12R ; E = produit 18R ; F = produit X1 ; G = produit Y1) pendant 24 hres. Les analyses cytofluorométriques ont été effectuées par un double immunomarquage à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-CD4-FITC et anti-CD8-PE. Les expériences ont été réalisées en triplicata. (* $p < 0,05$)

3.3.3.1- Production d'INF- γ par les lymphocytes de poussins SPF âgés de 14 jours.

Dans le but de vérifier si les modifications au niveau des sous-populations lymphocytaires entraînées par les dérivés de chitosane favorisent la voie CD4+ Th1, des lymphocytes spléniques de poussins SPF âgés de 14 jours ont été mis en culture en présence des différents dérivés de chitosane durant 24 heures. Les surnageants ont ensuite été récoltés et l'INF- γ aviaire a été mesuré à l'aide d'un test ELISA.

Tel que montré dans la figure 26A, dans un premier temps, les lymphocytes ont augmenté légèrement leur production d'INF- γ suite à leur stimulation par le LPS ($p < 0,05$). Tous les dérivés de chitosane ont généralement favorisé la production de l'INF- γ . La production d'INF- γ a été plus élevée avec le produit E à une concentration de 5 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,01$), augmentant à un niveau supérieur à celui obtenu avec le LPS. Les produits W, G, 12R et X1 ont tous augmenté la production d'INF- γ et ce, à toutes les concentrations testées ($p < 0,05$) bien que les concentrations optimales se situent généralement entre 5 et 20 $\mu\text{g/ml}$. Par contre, l'augmentation d'INF- γ était moins marquée avec les produits 12R à des concentrations de 1,25, 5 et 80 $\mu\text{g/ml}$.

Afin de vérifier si les dérivés de chitosane augmentaient aussi la production d'INF- γ chez des splénocytes via l'activation des macrophages résiduels dans la préparation cellulaire, les cellules ont été traitées avec du LPS en présence des dérivés de chitosane. Tel que montré à la figure 26B, les oligomères augmentaient ou diminuaient la production d'INF- γ induite par le LPS. En effet, les oligomères W, E, G, 18R, X1 et Y1 ont augmenté la production d'INF- γ à des concentrations moyennes (5 et 20 $\mu\text{g/ml}$) en présence de LPS ($p < 0,05$ à 0,01) et ce, à des niveaux plus élevés que celui obtenu avec le LPS seul ($p < 0,05$). Par contre, le produit 12R a entraîné une plus forte augmentation d'INF- γ à des concentrations de 5 et 20 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,05$ et 0,01) (Fig. 26B). D'autre part, les concentrations de 1,25 et de 80 $\mu\text{g/ml}$ ont généralement entraîné une légère diminution de la production d'INF- γ et ce, avec tous les produits.

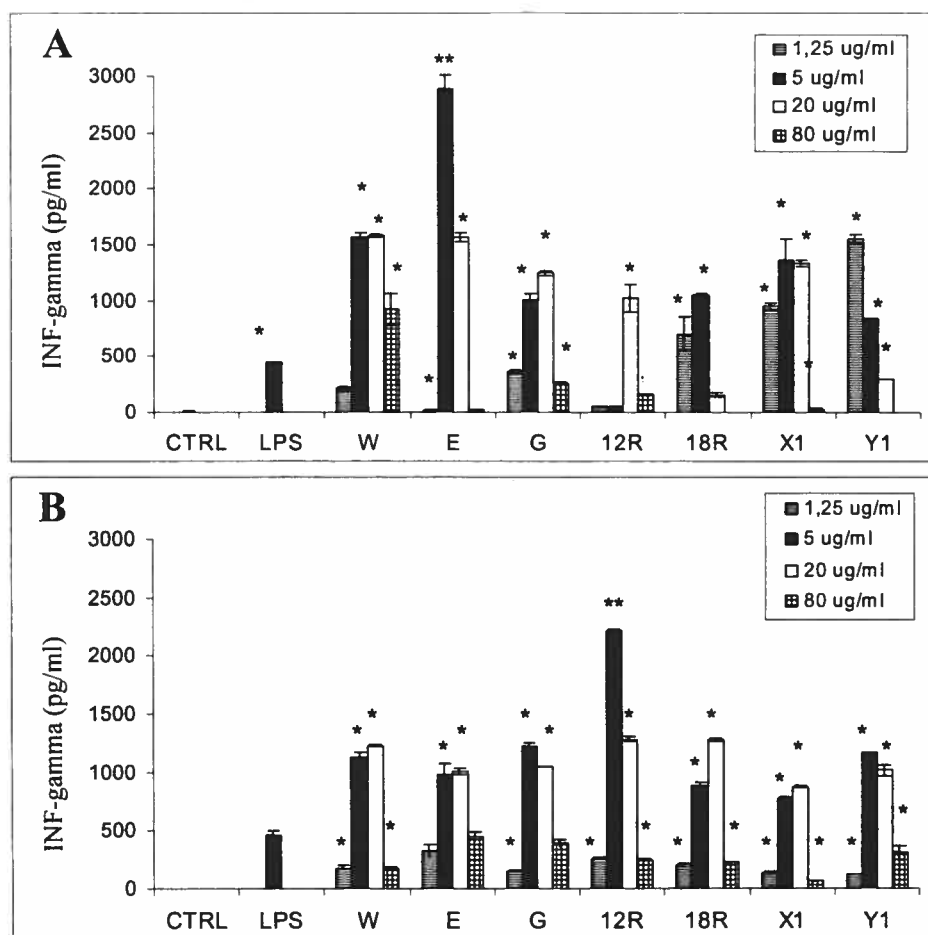


Figure 26: Production d'INF- γ par les lymphocytes spléniques de poussins SPF âgés de 14 jours non-stimulés (A) ou stimulés avec du LPS (0,5 $\mu\text{g/ml}$) (B) en présence de dérivés de chitosane de haut PM durant 24 hres. Les quantités d'INF- γ ont été mesurées à l'aide d'un test ELISA. Les expériences ont été réalisées en triplicata. Les niveaux d'INF- γ en présence des différents produits ont été comparés avec le niveaux des cellules contrôles (A) ou stimulées par le LPS (B). (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$)

3.3.3.2- Production de TGF- β 1 par les lymphocytes de poussins SPF âgés de 14 jours.

Afin de confirmer que la voie Th2 n'était que peu ou pas stimulée par les dérivés de chitosane, la production de TGF- β 1 par les lymphocytes spléniques de poussins SPF âgés de 14 jours a été évaluée. Tel que montré dans la figure 27, le LPS et la Con A n'ont que peu augmenté la production de TGF- β 1 ($p < 0,05$) alors que les produits W, E, 12R et Y1 n'ont pas augmenté la production de TGF- β 1. Par contre, le produit 18R à la plus faible concentration étudiée a augmenté le TGF- β 1 au même niveau que ceux atteints par le LPS et la Con A ($p < 0,05$). Malheureusement, cet effet du produit 18R a disparu à des concentrations plus élevées. Cet effet inhibiteur a aussi été mis en évidence avec le produit G à des concentrations variant de 5 à 80 $\mu\text{g/ml}$ et le produit X1 à des concentrations de 5 et 20 $\mu\text{g/ml}$ ($p \leq 0,05$).

3.3.3.3- Effets des dérivés de chitosane de haut PM sur la production de cytokines lymphocytaires (INF- γ et TGF- β 1) chez des poulets adultes.

L'analyse phénotypique des populations lymphocytaires de poulets adultes a montré que les lymphocytes CD4+CD8- étaient plutôt diminués avec les dérivés de chitosane à l'avantage des CD4-CD8+ et des CD4+CD8+. Il est possible que la production de l'INF- γ induite par les dérivés de chitosane soit modifiée selon la nature de la cellule stimulée. Ainsi, l'INF- γ et le TGF- β 1 ont été mesurés dans les surnageants de lymphocytes spléniques de poulets adultes en présence des différents dérivés de chitosane. Lorsque les splénocytes de poulets adultes ont été mis en contact avec les dérivés de chitosane de haut PM, la sécrétion d'INF- γ a été augmentée avec tous les produits ($p < 0,05$ à 0,01) (Fig. 28). La plus forte induction a été obtenue avec le produit W (1,25, 5 et 20 $\mu\text{g/ml}$) ($p < 0,01$). D'autre part, le niveau basal de TGF- β n'a pas été augmenté par les différents oligomères sauf à quelques exceptions (Fig. 28B). Ainsi, une certaine augmentation de TGF- β 1 a été observée avec quelques produits (W, X1 et Y1) mais les niveaux sont restés extrêmement faibles (inférieur à 30 pg/ml) ($p < 0,05$). Les faibles concentrations des produits ont généralement donné de meilleures augmentations

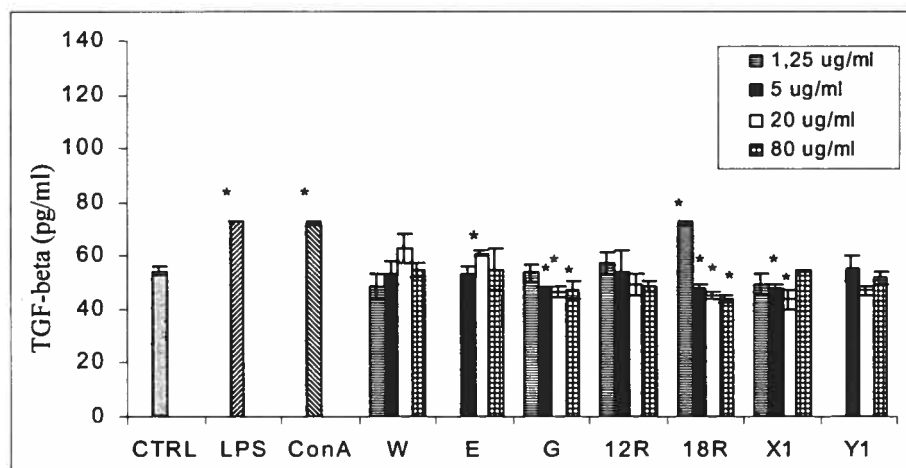


Figure 27: Production de TGF- β 1 par les lymphocytes spléniques de poussins SPF âgés de 14 jours en présence de dérivés de chitosane de haut PM pendant 24hres. Les quantités de TGF- β 1 ont été mesurées à l'aide d'un test ELISA. Les expériences ont été réalisées en triplicata. (* $p < 0,05$)

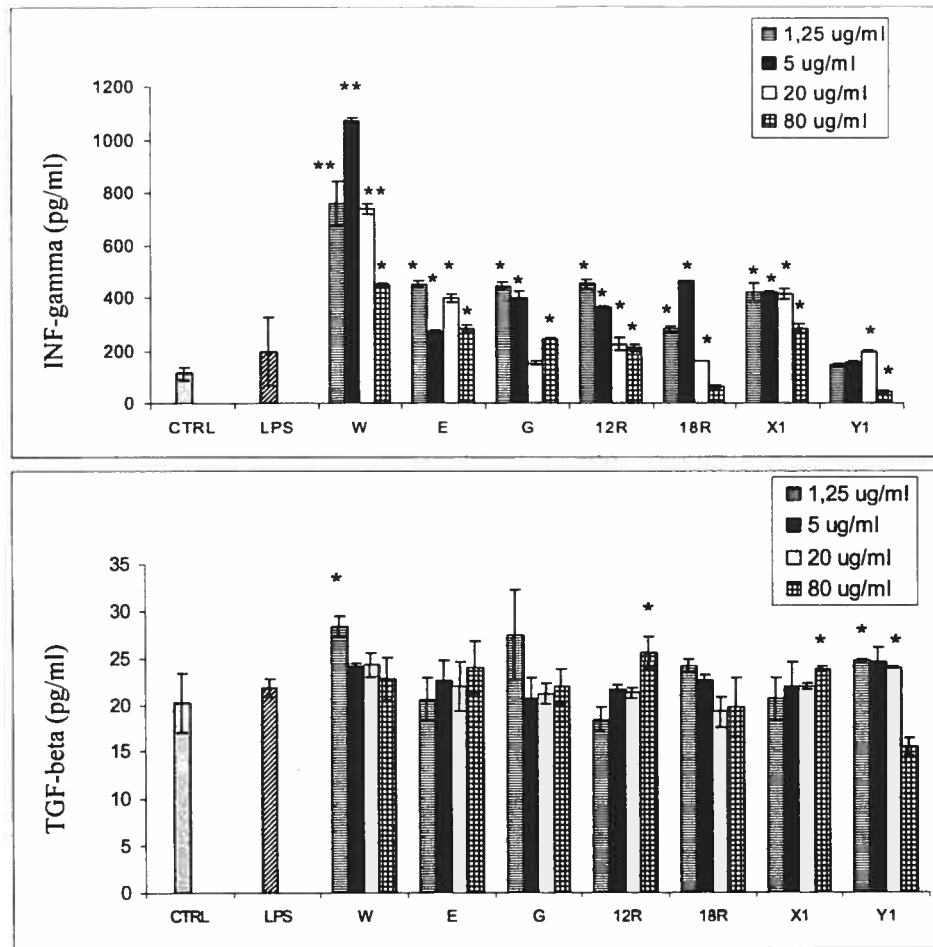


Figure 28: Production d'INF- γ (A) et de TGF- β 1 (B) par les lymphocytes spléniques de poulets adultes en présence de dérivés de chitosane de haut PM durant 24 hres. Les productions de cytokines ont été évaluées à l'aide d'un test ELISA. Les expériences ont été réalisées en triplicata. (*p<0,05 **p<0,01)

d'INF- γ que les plus fortes. Le produit Y1 n'a donné que très peu d'effet stimulant sur la production d'INF- γ .

Dans un second temps, ces cytokines ont été évaluées chez des lymphocytes spléniques en présence de LPS et des dérivés de chitosane. La figure 29A montre une production plus élevée d'INF- γ par les cellules-contrôles (niveau près de 5 fois supérieur aux cellules-contrôles de la figure 28A). Ceci est également confirmé par le faible taux de production de TGF- β 1 par ces cellules, contrairement à celui ayant été observé à la figure 27B. Il est possible de constater qu'en présence de LPS, les dérivés de chitosane ont inhibé la production d'INF- γ , à l'exception du produit W qui en a augmenté la sécrétion ($p \leq 0,01$). Seule la plus faible concentration du produit Y1 a augmenté la production d'INF- γ ($p < 0,01$). Par contre, cette inhibition d'INF- γ a été accompagnée d'une augmentation de la production de TGF- β 1 par tous les dérivés à des niveaux comparables ou supérieurs à celui induit par le LPS ($p < 0,05$ à $0,01$) (Fig. 29B).

Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que les différents oligomères de haut PM de glucosamine favorise la voie immunitaire Th1 au détriment de la voie Th2 et que cette activation s'exprime par l'augmentation des lymphocytes CD4+CD8-, CD4-CD8+ ou CD4+CD8+ et l'INF- γ en fonction de la nature du dérivé, de son PM mais surtout du degré de maturité immunologique du poulet.

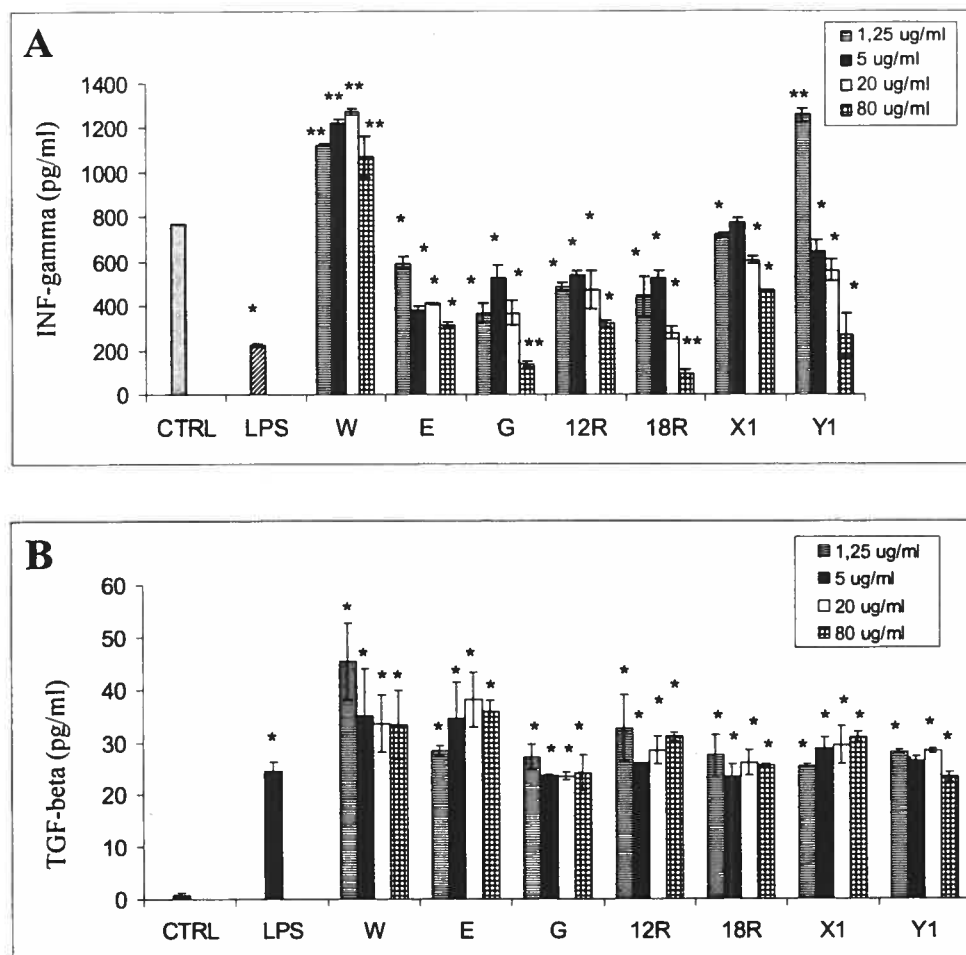


Figure 29: Production d'INF- γ (A) et de TGF- β 1 (B) par les lymphocytes spléniques de poulets adultes activés par du LPS (0,5 μ g/ml) en présence de dérivés de chitosane de haut PM durant 24 hres. Les productions de cytokines ont été évaluées à l'aide d'un test ELISA. Les expériences ont été réalisées en triplicata. (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$)

		LPS	PEP	A	B	AB	D	W	JF
Cytotoxicité des oligomères de chitosane de faible PM									
Nécrose		n.d.	n.d.	n.d.	↓	n.d.	↑	↓	n.d.
Apoptose		n.d.	n.d.	n.d.	↑↓	n.d.	↓	↑↓	n.d.
Activation des lymphocytes spléniques de souris C57BL/6 par les dérivés de chitosane									
Lymphocytes (PEP-)		-	-	-	-	-	-	-	-
Lymphocytes activés (PEP+)		-	-	-	-	-	-	-	-
Activation des lymphocytes spléniques en présence de surnageants de macrophages péritonéaux traités avec les dérivés de chitosane									
Macrophages non activés (PEP-)		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	n.d.
Macrophages activés (PEP+)				↓	↓	↓	↓	↓	n.d.
Production de cytokines par les macrophages péritonéaux non activés (PEP-) ou activés (PEP+) en réponse aux dérivés de chitosane									
TNF-α	PEP-	↑↑	↑↑	-	-	n.d.	↑	↑	↑↑
	PEP+			↑	-	-	-	-	-
IL-6	PEP-	↑↑	↑↑	↓	↑↓	n.d.	-	↑↓	↑↑
	PEP+			↓	↓	-	↓	-	-
IL-10	PEP-	↑↑	↑↑	-	↑	↑	↑	↑	n.d.
	PEP+			-	↓	-	-	↑	↑
TGF-β1	PEP-	↑	↑↑	↑	↑	↑	↑	↑	n.d.
PGE ₂	PEP-	n.d.	n.d.	-	↑↓	-	↑↓	↑↓	↑↑
	PEP+			-	-	↓	↑↓	↓	↑↓

Tableau II : Tableau récapitulatif des effets *in vitro* des dérivés de chitosane de faible PM sur différentes fonctions immunitaires de souris C57BL/6. Les effets activateurs (↑) ou inhibiteurs (↓) des dérivés de chitosane sont mesurés par rapport au contrôle cellulaire en absence (PEP-) ou en présence (PEP+) de PEP. Lorsque les effets varient selon la concentration du produit, le sigle (↑↓) est utilisé. N.d. : non disponible.

	LPS	PEP	A	B	AB	D	W	JF	
Identification des voies de signalisation intracellulaire activées chez les macrophages péritonaux activés (PEP+) de souris C57BL/6									
NF- κ B			-	-	n.d.	↓	-	n.d.	
p38MAPK			-	↑	n.d.	-	-	n.d.	
Production de cytokines et de leptine par les adipocytes de souris C57BL/6 activés ou non (PEP+ ou PEP-) traités avec les dérivés de chitosane									
TNF- α (PEP-)	↑	n.d.	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
IL-6 (PEP-)	↑	n.d.	↑↑	↑	↑	↑	↑	↑	
IL-1 β (PEP-)	-	n.d.	↑	↑	-	↑	↑	-	
PGE ₂ (PEP-)	-	↓	↓	↓↓	↓	↓↓	↓	↓	
Leptine	PEP-	↑	↑	↑	↑	n.d.	↑	n.d.	n.d.
	PEP+			↑↓	↑↓	n.d.	↓	n.d.	n.d.

Tableau II (suite) : Tableau récapitulatif des effets *in vitro* des dérivés de chitosane de faible PM sur différentes fonctions immunitaires de souris C57BL/6. Les effets activateurs (↑) ou inhibiteurs (↓) des dérivés de chitosane sont mesurés par rapport au contrôle cellulaire en absence (PEP-) ou en présence (PEP+) de PEP. Lorsque les effets varient selon la concentration du produit, le sigle (↑↓) est utilisé. N.d. : non disponible.

		LPS	ConA	W	E	G	12R	18R	X1	Y1
Activation des lymphocytes spléniques non activés (LPS-) ou activés (LPS+) et traités avec les dérivés de chitosane										
SPF 7j.	LPS-	-	↑↑	↓	-	↓	↓	-	↓	-
SPF 14j.	LPS-	-	↑↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-
	LPS+		↑	↑	↑	-	-	↑	-	↑
Poulets adultes LPS-		-	↑↑	↑	↑	-	↑	↑	-	-
Activation des lymphocytes spléniques par des surnageants de macrophages spléniques non activés (LPS-) ou activés (LPS+) par les dérivés de chitosane										
SPF 14j.	LPS-	-	↑	-	-	↓	-	↓	↓	↓
	LPS+		-	-	-	-	-	-	-	-
Modulation des sous-populations de lymphocytes spléniques non activés (LPS-) ou activés (LPS+) et traités avec les dérivés de chitosane										
Poussins SPF 14 jours d'âge										
LPS-	CD4+CD8-	-	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-
	CD4-CD8+	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-
	CD4+CD8+	-	↑	-	-	-	-	-	-	-
	CD3-CD8+	↑	-	↑	↑	↑	↑	-	-	↑
LPS+	CD4+CD8-		n.d.	↑	↓	-	-	↓	↑	-
	CD4-CD8+		n.d.	-	-	-	-	↓	↓	-
	CD4+CD8+		n.d.	↑	-	↑	↑	↑	↑	-
	CD3-CD8+		n.d.	-	-	-	-	-	-	-

Tableau III : Tableau récapitulatif des effets *in vitro* des dérivés de chitosane de faible PM sur différentes fonctions immunitaires de souris C57BL/6. Les effets activateurs (↑) ou inhibiteurs (↓) des dérivés de chitosane sont mesurés par rapport au contrôle cellulaire en absence (PEP-) ou en présence (PEP+) de PEP. Lorsque les effets varient selon la concentration du produit, le sigle (↑↓) est utilisé. N.d. : non disponible.

		LPS	ConA	W	E	G	12R	18R	X1	Y1
Poulets adultes										
LPS-	CD4+CD8-	n.d.	n.d.	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-
	CD4-CD8+	n.d.	n.d.	↑	↑	↑	↑	↑	-	↑
	CD4+CD8+	n.d.	n.d.	-	↑	-	-	↑↑	-	-
Production de cytokines par les lymphocytes spléniques non activés (LPS-) ou activés (LPS+) et traités avec les dérivés de chitosane										
Poussins SPF 14 jours d'âge										
INF- γ	LPS-	↑	n.d.	↑	↑↑	↑	↑	↑	↑	↑
	LPS+		n.d.	↑↓	↑	↑↓	↑↑	↓	↑↓	↑↓
TGF- β 1	LPS-	↑	↑	-	-	↓	-	↑↓	↓	-
Poulets adultes										
INF- γ	LPS-	-	n.d.	↑↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑↓
	LPS+		n.d.	↑↑	↓	↓	↓	↓	↓	↑↓
TGF- β 1	LPS-	-	n.d.	↑	-	-	-	-	-	↑
	LPS+		n.d.	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑↓

Tableau III (suite): Tableau récapitulatif des effets *in vitro* des dérivés de chitosane de faible PM sur différentes fonctions immunitaires de souris C57BL/6. Les effets activateurs (↑) ou inhibiteurs (↓) des dérivés de chitosane sont mesurés par rapport au contrôle cellulaire en absence (PEP-) ou en présence (PEP+) de PEP. Lorsque les effets varient selon la concentration du produit, le sigle (↑↓) est utilisé. N.d. : non disponible.

4- DISCUSSION

4.1- Effets *in vivo* des dérivés de chitosane dans un modèle d'ostéoarthrite induit par la carragénine.

Le modèle *in vivo* d'OA induit par la carragénine a permis l'étude des propriétés anti-inflammatoires du produit OligoviaTM, un dérivé de chitosane. Les résultats préliminaires obtenus conjointement avec les chercheurs d'ISM Biopolymer Inc. (Dr Nathalie Côté) sur la capacité de ce produit à diminuer l'enflure suite à une injection intra-articulaire de carragénine ouvrent une avenue intéressante pour étudier les effets des dérivés du chitosane sur la production des cytokines inflammatoires par différents types cellulaires. La carragénine constitue la substance de choix dans un modèle *in vivo* d'induction d'OA. En effet, ce polysaccharide de haut PM dérivé de l'algue rouge est reconnu pour induire une inflammation locale aiguë lorsqu'administré dans différents tissus (Nantel *et al.*, 1999). La carragénine déclenche une OA via ses effets sur différents facteurs de l'inflammation. Récemment, il a été montré que la carragénine induisait une surexpression de la MMP-12 favorisant l'aggravation des lésions arthritiques, un épaissement sévère de la membrane synoviale et l'infiltration importante de macrophages en phase précoce, suivie d'une destruction du cartilage en phase plus tardive (Wang *et al.*, 2004). Cette infiltration de macrophages pourrait expliquer l'induction de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12, la PGE₂ et le NO suite à l'administration de la carragénine (De Ceuninck *et al.*, 2004). La production de ces cytokines est reliée à l'activation du facteur NF- κ B dans les leucocytes recrutés au début de l'inflammation, alors que l'activation de ce facteur de transcription lors de la phase de résolution est associée à l'expression de gènes anti-inflammatoires et à l'induction de l'apoptose (Lawrence *et al.*, 2001).

Bien que les résultats préliminaires ne soient pas statistiquement significatifs, les observations effectuées semblent suggérer que la glucosamine administrée oralement pourrait inhiber l'enflure dès 14 jours après le début du traitement, ce qui correspond à la fin de la phase aiguë et au début de la phase chronique de la maladie, tel que déjà montré par Hua *et al.* (2005). Par contre, le produit OligoviaTM pourrait être plus efficace que la glucosamine pour diminuer l'enflure rapidement même à des concentrations quatre fois plus faibles que la dose équivalente recommandée de glucosamine. Les

observations qualitatives suggèrent toutefois que la glucosamine pourrait être plus efficace dans la phase chronique de l'OA, i.e. une fois que l'inflammation est bien installée, alors que le produit OligoviaTM pourrait entraîner une diminution plus rapide de l'enflure lors de la phase tardive de l'inflammation.

Ces premiers résultats demeurent toutefois non significatifs et de nouvelles expériences seront effectuées par ISM Biopolymer Inc. avec un plus grand nombre d'individus afin de déterminer de façon plus précise les variations entre les différents traitements.

Par contre, nous avons observé chez des souris supplémentées avec l'OligoviaTM durant 28 jours après l'induction de l'OA, une diminution de PGE₂ suggérant un effet de ce produit sur le niveau de PGE₂. La PGE₂ est un important médiateur inflammatoire de l'OA et est produit par les chondrocytes activés (Crofford *et al.*, 1994). Nos résultats, bien que statistiquement non significatifs, suggèrent que le produit OligoviaTM (groupe C) tend à diminuer la production de PGE₂, contrairement à la glucosamine (groupe E) qui présente des niveaux de PGE₂ comparables à ceux obtenus avec le glucose (groupe A). Cependant, Hua *et al.* (2005) ont obtenu des résultats différents dans un modèle expérimental d'arthrite induite par l'adjuvant de Freund. La nature de l'inflammation engendrée par l'adjuvant de Freund et la carragénine semble comparable car les deux substances ont rapidement entraîné l'enflure des tissus qui, dans les deux cas, a atteint un maximum entre 4 et 7 jours. En effet, ces auteurs ont montré que la diminution des lésions par la glucosamine était accompagnée d'une diminution de la production de PGE₂ et de NO sans identifier la voie par laquelle ces diminutions étaient induites.

A ce jour, aucune étude n'a identifié le mécanisme par lequel des dérivés du chitosane pourrait diminuer la production de PGE₂. Il est possible que les dérivés de chitosane que contient l'OligoviaTM inhibent plutôt la production de la PGE₂ par les macrophages présents dans le liquide synovial. En effet, les macrophages font partie des cellules retrouvées en quantité importante dans le liquide synovial des patients atteints d'OA et produisent de la PGE₂ lorsqu'ils sont activés. Il a été montré que le chitosane peut inhiber la production de la PGE₂ chez les macrophages en inhibant la COX-2 (Chou

et al., 2003). Quoique les dérivés du chitosane partiellement déacétylés contenus dans le produit Oligovia™ possèdent des PM plus faibles que le chitosane, nous pouvons supposer que le produit Oligovia™ diminuerait les niveaux de la PGE₂ produite par les macrophages en inhibant la COX-2.

D'autre part, la production d'IL-10 retrouvée dans le liquide synovial des souris traitées avec le produit Oligovia™ est une autre avenue d'explication des effets anti-inflammatoires de ce produit. La glucosamine et l'Oligovia™ ont tous deux entraîné une plus forte production d'IL-10 comparativement au contrôle glucose. Ainsi, le produit Oligovia™ favorise la présence d'IL-10 à des niveaux comparables à ceux induits par la glucosamine. Par contre, la variation individuelle est plus forte avec le produit Oligovia™ qu'avec la glucosamine. La présence d'IL-10 dans le liquide synovial de patients atteints d'OA est une observation fréquente (Martel-Pelletier *et al.*, 1999). Il a été proposé que la présence de cette cytokine préviendrait ou corrigerait la dégradation du cartilage en supprimant les effets du TNF- α et de l'IL-1 (Van Roon *et al.*, 1996 ; Fernandes *et al.*, 2002). Des études génétiques récentes montrent qu'une diminution dans la capacité à produire de l'IL-10 chez l'humain augmente le risque d'OA (Fytili *et al.*, 2005 ; Riyana *et al.*, 2005).

D'autre part, le chitosane étant formé de molécules de glucosamine et de N-acétylglucosamine, il est possible que les effets de l'Oligovia™ reflètent les propriétés de la glucosamine. Les résultats observés chez les souris ayant été supplémentées avec de la glucosamine suggèrent que ce produit aurait aussi des effets anti-inflammatoires et favoriserait la production d'IL-10. Selon des données de nature empirique, ce produit naturel, largement utilisé pour soulager l'OA, présenterait des avantages par rapport aux autres médicaments utilisés, tels les NSAID comme l'ibuprofène. En effet, les NSAID ne sont efficaces que pour soulager les symptômes associés à l'arthrite comme la douleur et l'œdème, et ne protègent pas contre les lésions articulaires (Santana-Sabagun et Weisman, 2001). Il a récemment été montré que la glucosamine diminuait les lésions inflammatoires de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale chez la souris en stimulant la production de l'IL-10 par les splénocytes des souris traitées (Zhang *et al.*, 2005). Présentement, il est plutôt suggéré que l'efficacité de la glucosamine dans le

traitement de l'arthrite serait due à sa capacité à inhiber la dégradation du cartilage et à augmenter la synthèse de protéoglycanes (Gouze *et al.*, 2002), ce qui serait un avantage important puisque des études ont montré que l'ibuprofène et la fénoprofène, deux NSAID, réduisent la synthèse de glucosaminoglycanes par les chondrocytes (Palmoski et Brandt, 1980).

Lors d'études pré-cliniques, les effets de la glucosamine et du produit OligoviaTM sur la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires devraient être comparés à ceux induits par un NSAID.

4.2- Effets des dérivés de chitosane sur les interactions cellulaires dans un modèle murin.

La stimulation des cellules NK et des lymphocytes CD4⁺ de type Th1, producteurs d'IFN- γ , est une étape inévitable dans le maintien de la réponse inflammatoire suite à la phase aiguë, ce qui est rencontré dans les maladies inflammatoires chroniques. Nous avons montré que les dérivés de chitosane que nous avons étudiés n'ont pas la capacité de stimuler l'activité métabolique des lymphocytes de la rate. Cet effet pourrait être dû à une incapacité des dérivés de chitosane à se fixer à la surface des lymphocytes et à activer ensuite des voies de signalisation intracellulaire menant à une hausse de l'activité cellulaire des lymphocytes. En effet, Feng *et al.* (2004) ont montré que les oligomères de chitosane se fixent aux récepteurs de mannose présents à la surface des cellules. Or, les lymphocytes sont dépourvus de ces récepteurs et ne peuvent pas fixer les dérivés de chitosane.

Par contre, certaines cytokines produites par les macrophages sont capables d'activer les lymphocytes de façon non spécifique. La présence de récepteurs mannose à la surface des macrophages leur permet d'être activés par les dérivés de chitosane. Ainsi, nous avons montré que les dérivés du chitosane pouvaient augmenter l'activité métabolique des lymphocytes spléniques des souris à des niveaux souvent comparables ou supérieurs à ceux induits par le LPS et le PEP lorsqu'ils étaient incubés avec des surnageants de macrophages préalablement traités avec les dérivés de chitosane. Les

effets stimulants, par contre, variaient selon le dérivé. Le produit W s'est avéré être le moins stimulant alors que les produits A et B ou leur mélange entraînaient une augmentation de l'activité métabolique des lymphocytes. Par contre, lorsque les macrophages étaient activés par le PEP et ensuite traités avec les différents dérivés de chitosane, l'activité métabolique des lymphocytes n'était plus induite, ce qui suggère que les macrophages ne produisent pas les mêmes facteurs immunomodulateurs ou dans des quantités différentes en présence des dérivés de chitosane selon leur niveau d'activation.

Il est connu que l'activation des macrophages par les oligomères de chitosane entraîne l'expression de marqueurs d'activation tels que les récepteurs Fc, Fas, H-2D^d, I-A^d ou les récepteurs à la transferrine et à la MIP-2 à la surface des cellules. Les oligomères induisent également la production de cytokines macrophagiques telles que le TNF- α et l'IL-1 β capables d'activer les lymphocytes (Mori *et al.*, 2005).

Tel que montré dans ce travail, les dérivés de chitosane n'induisent que peu ou pas la production de TNF- α par les macrophages non-activés. Seul les dérivés W et JF ont entraîné une légère production de cette cytokine en fonction de la concentration. D'autre part, la stimulation des macrophages par le PEP a induit une forte production de TNF- α mais de façon générale, les dérivés du chitosane n'ont pas diminué ou augmenté la production de cette cytokine. Chou *et al.* (2003) a montré que le chitosane inhibait la production de TNF- α par les macrophages alors que Feng *et al.* (2004) ont observé que les dérivés de chitosane, de plus petite taille, induisaient de façon significative la production de TNF- α chez les macrophages. Ceci suggère donc que les effets du chitosane sur les cellules sont en fonction de la taille de la molécule. Ainsi, il est possible que les plus grosses molécules ne se fixent pas aux récepteurs mannose mais plutôt à d'autres récepteurs non identifiés qui déclenchent des voies de signalisation intracellulaire différentes menant à d'autres effets. La concentration intracellulaire de résidus GlcNAc est une autre hypothèse qui pourrait expliquer les différents effets chez les macrophages. En effet, après la fixation (par les résidus GlcNAc) (Feng *et al.*, 2004) et l'internalisation, les molécules de chitosane seraient dégradées en GlcNAc par les

lysosomes (Yomota *et al.*, 1990). Ainsi les concentrations en résidus acétylés pourraient varier en fonction de la grosseur initiale de la molécule et de son degré d'acétylation.

Les dérivés de chitosane n'ont toutefois eu aucun effet sur la production de TNF- α en situation d'inflammation, i.e. lorsque les macrophages sont déjà en état d'activation, dans ce cas-ci par le PEP. Ceci pourrait peut-être être dû aux concentrations d'oligomères testées qui étaient peut-être trop faibles pour produire des niveaux de cytokines anti-inflammatoires suffisants chez les macrophages pour contrecarrer l'activation des lymphocytes induite par le PEP.

Cet effet différentiel entre la réaction des macrophages non-activés ou activés par le PEP vis-à-vis les effets des dérivés du chitosane se retrouve aussi avec d'autres cytokines. Ainsi, l'IL-6 est augmentée par tous les dérivés de chitosane mais surtout par le dérivé JF qui rejoint les niveaux d'IL-6 induits par le LPS et le PEP, alors que les dérivés de chitosane ne peuvent diminuer fortement la production de cette cytokine chez les macrophages déjà stimulés par le PEP.

Ces résultats suggèrent que l'augmentation d'activité métabolique observée chez les lymphocytes pourrait être due en partie à la production de l'IL-6 en réponse aux effets des dérivés du chitosane sur les macrophages. Il est bien connu que la production d'IL-6 par les macrophages dépend du niveau de TNF- α et d'IL-1 (Martens *et al.*, 1993). Effectivement, les dérivés du chitosane qui stimulent la production de TNF- α chez les macrophages stimulent aussi la production d'IL-6, tels que les produits JF et W. L'IL-6 peut activer les lymphocytes B et les lymphocytes Th2 (Levy *et al.*, 1990). L'analyse phénotypique des populations lymphocytaires incubées avec les surnageants de macrophages traités avec les dérivés de chitosane n'a pas permis de mettre en évidence des différences importantes dans les sous-populations de lymphocytes T et B, suggérant que l'influence des cytokines induites par les dérivés de chitosane n'est pas suffisamment forte pour entraîner des changements importants dans les pourcentages des populations cellulaires. Par contre, il est possible de postuler que les cytokines produites pourraient agir sur le phénotype fonctionnel de ces lymphocytes, tel que l'activation des Th0 en Th1 ou Th2 et moduler la réponse inflammatoire.

D'autre part, les macrophages activés peuvent produire des cytokines suppressives suite à leur contact avec les différents dérivés du chitosane. Ainsi, nous avons montré que les dérivés du chitosane entraînaient la production d'IL-10, quoiqu'à des niveaux faibles chez des macrophages non-activés. Par contre, l'activation des macrophages par le PEP augmente fortement la production de cette cytokine et cette augmentation est encore plus forte en présence des produits W et JF. Cet effet des dérivés du chitosane sur la production d'IL-10 est particulièrement intéressant car cette cytokine peut diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages, tels que le TNF- α et les IL-1, -6, -8, et -12 (Bogdan *et al.* 1991; Fiorentino *et al.* 1991). Par contre, les produits W et JF ne diminuent pas de façon importante les niveaux d'activation des lymphocytes spléniques et la production du TNF- α et de l'IL-6 par les macrophages préalablement activés par le PEP. Il est possible que l'augmentation d'IL-10 induite par les produits W et JF ne soit pas suffisamment importante pour contrer les effets inflammatoires du PEP selon les conditions *in vitro* utilisées dans ce travail. Aussi, les macrophages activés produisent déjà des niveaux élevés d'IL-10, ce qui peut masquer les effets plus mitigés des dérivés du chitosane (Sornasse *et al.*, 1996). Il a récemment été montré que le chitosane peut stimuler la production d'IL-10 au niveau des muqueuses et dans la rate en même temps que l'IL-4 et le TGF- β , favorisant le développement des lymphocytes suppresseurs de phénotype Th3 (Porporatto *et al.*, 2005). D'autre part, la glucosamine est aussi connue pour augmenter la production d'IL-5 et d'IL-10 par les splénocytes murins (Zhang *et al.*, 2005). Comme les dérivés du chitosane utilisés dans ce travail sont des oligomères de différents PM contenant, entre autre, des molécules de glucosamine, il était prévisible que ces produits induisent ou augmentent la production d'IL-10 comme il a déjà été démontré avec le chitosane ou la glucosamine. Les effets du produit OligoviaTM et de la glucosamine sur les cytokines inflammatoires peuvent résulter d'une inhibition de l'activation du NF- κ B, impliqué dans l'activation des gènes codant pour ces cytokines. Cette hypothèse n'a été que partiellement vérifiée par le dosage du niveau de NF- κ B par un test ELISA et les résultats suggèrent que la glucosamine diminue le niveau de ce facteur de transcription. Le produit OligoviaTM semble aussi diminuer l'expression du NF- κ B mais de façon

statistiquement non-significative dans les conditions expérimentales utilisées. Nos résultats diffèrent de ceux récemment observés avec des oligomères de chitosane d'un PM de 1000 Da et d'un degré d'acétylation 15% où le NF- κ B était activé résultant en une production de NO et de iNOS (Yu *et al.*, 2004). La glucosamine montre un effet contraire puisqu'elle peut diminuer les niveaux de NF- κ B et d'IL-1 chez des chondrocytes lors d'OA (Largo *et al.*, 2003). Par contre, les effets inhibiteurs du NF- κ B par la glucosamine ou les oligomères de chitosane n'ont pas encore été rapportés. Cet effet de la glucosamine, et possiblement de certains dérivés de la chitosane, pourrait expliquer les effets anti-inflammatoires préalablement observés.

Le TGF- β 1 est une autre cytokine immunosuppressive qui pourrait expliquer les effets anti-inflammatoires de certains dérivés du chitosane. Ainsi, nous avons observé que les dérivés du chitosane pouvaient tous induire la production de TGF- β par des macrophages non stimulés. Le produit W s'est avéré être le meilleur inducteur de cette cytokine, rejoignant les niveaux atteints par le LPS ou le PEP. L'administration de glucosamine stimule la voie de biosynthèse des hexosamines et peut induire la production de TGF- β , tel que démontré dans les cellules mésangiales (Weigert *et al.*, 2003). D'autre part, le chitosane peut directement induire la production du TGF- β par les macrophages ainsi que le facteur de croissance des plaquettes favorisant la réparation tissulaire (Ueno *et al.*, 2001). Cette propriété du chitosane, et particulièrement des dérivés du chitosane que nous avons étudiés, pourrait résulter de la présence de glucosamine et de sa capacité à stimuler la production de cette cytokine.

La capacité du produit W à induire autant l'IL-10 que le TGF- β suggère que les effets anti-inflammatoires observés seraient directement reliés à la production de ces cytokines immunosuppressives. Par contre, le TGF- β est une cytokine impliquée aussi dans le métabolisme du glucose et peut indirectement entraîner la production d'adipokines ou de cytokines par les cellules adipeuses, augmentant ainsi la complexité des effets immunomodulateurs des dérivés de chitosane.

Le tissu adipeux joue un rôle important dans la réponse inflammatoire grâce à la capacité des adipocytes à produire des cytokines inflammatoires. Ces cytokines

représentent une proportion non négligeable des cytokines retrouvées en circulation et leur implication dans la modulation de la réponse immunitaire doit être prise en considération. Il a été montré que les adipocytes isolés à partir de la région paramétriale de souris C57BL/6 sont sensibles aux effets des dérivés de chitosane. En effet, les oligomères ont principalement induit la production de TNF- α , d'IL-6 et de leptine tout en inhibant la production de PGE₂. Ceci confirme que les dérivés de chitosane entraînent chez les adipocytes une réponse de type Th1. En effet, les effets engendrés par la production de TNF- α favorisent une réponse de type cellulaire par l'activation et la prolifération des lymphocytes T ainsi que par l'activation des macrophages à produire des cytokines macrophagiques pro-inflammatoires telles que l'IL-1 et l'IL-6 favorisant une réponse cellulaire. L'IL-6 produit par les adipocytes représente près de 30% de l'IL-6 circulant (Fain *et al.*, 2004), ce qui implique que la participation des adipocytes est nécessaire au bon déroulement de la réponse immunitaire et il est fort probable que sans ces cellules, certains éléments importants de la réponse inflammatoire, soit la génération des lymphocytes T cytotoxiques, l'activation des cellules NK et l'induction de la production de l'INF- γ chez celles-ci, soient négligées. L'inhibition de la production de la PGE₂ chez les adipocytes au contact des dérivés de chitosane est également un élément important qui appuie le rôle pro-inflammatoire des adipocytes dans la réponse immunitaire. En effet, Bloom *et al.* (1999), Hilkens *et al.* (1996) et Hinz *et al.* (2000) ont montré que la PGE₂ joue un rôle important dans la modulation de la réponse inflammatoire en tant que molécule anti-inflammatoire en augmentant, entre autre, la réponse de type Th2, en modulant la production de cytokines inflammatoires et en augmentant les cytokines anti-inflammatoires. La leptine est également considérée comme une cytokine au sein du système immunitaire, pro-inflammatoire de surcroît. Ainsi, il a été montré que des surnageants de macrophages traités avec les dérivés de chitosane ont un léger effet inducteur sur la production de leptine par les adipocytes. Etant donné les implications de la leptine dans la réponse inflammatoire, telles que la modulation du profil de production de cytokines chez les lymphocytes T vers la voie Th1, l'augmentation de l'expression de marqueurs d'activation à la surface des lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ et l'induction de la production de TNF- α et d'IL-1 chez les macrophages (Loffreda *et al.*, 1998), son induction par les dérivés de chitosane confirme

encore une fois ses effets immunostimulants. Les voies de signalisation activées par la leptine chez les cellules immunitaires n'ont pas encore été identifiées. Toutefois, Maroni *et al.* (2005) ont montré que la leptine augmente de façon significative la phosphorylation de la p38MAPK qui participe au mécanisme de transduction de signal de la leptine chez les cellules des muscles squelettiques. Il est possible que cette même voie soit empruntée chez les cellules inflammatoires. Fantuzzi et Faggioni (2000) ont indiqué que l'activité modulatrice de la leptine dans la réponse inflammatoire n'est observée qu'en présence de co-stimuli. D'après Maruna *et al.* (2001), la production de leptine par les adipocytes pendant la réponse inflammatoire est induite par des cytokines pro-inflammatoires. Le mécanisme d'induction n'est pas encore élucidé mais il semblerait que le TNF- α et l'IL-1 soient les principales cytokines impliquées dans l'induction de leptine chez les adipocytes. Tel que décrit précédemment, les dérivés de chitosane induisent chez les macrophages la production de TNF- α , ce qui pourrait expliquer l'induction de leptine observée chez les adipocytes au contact des surnageants de macrophages traités avec les oligomères.

4.3- Effets des dérivés de chitosane dans la modulation de la réponse inflammatoire du poulet.

L'industrie mondiale de la volaille fournit une proportion substantielle des besoins nutritionnels de la population humaine. Toutefois, cette industrie est menacée par l'augmentation de l'incidence de maladies aviaires de nature bactérienne ou virale qui ont des répercussions désastreuses sur la productivité de cette industrie et entraînent des pertes économiques de plus en plus importantes. L'avènement de la résistance aux antibiotiques a poussé l'industrie à se tourner vers la vaccination des poussins en bas âge pour prévenir l'éclosion, entre autre, de maladies gastro-intestinales. Toutefois, cette pratique n'est pas totalement efficace dû au fait qu'au moment de la vaccination, le système immunitaire des poussins n'est pas suffisamment développé pour entraîner une immunisation efficace. Il est donc inévitable de trouver des moyens d'augmenter la réponse immunitaire à la vaccination.. Les dérivés de chitosane pourraient jouer ce rôle.

Des tests préliminaires ont confirmé que les poussins de moins de 14 jours ne possédaient pas un système immunitaire suffisamment développé pour engendrer une réponse. Ceci concorde avec les observations décrites par Weill et Reynaud (1987) comme quoi la prolifération des cellules B dans la bourse de Fabricius débute autour du jour 12 du développement embryonnaire et se poursuit jusqu'à plusieurs semaines post-éclosion, et malgré que l'émigration des lymphocytes B matures débute au jour 18 du développement embryonnaire, il est possible qu'à 7 jours post-éclosion la quantité de cellules ne soit pas assez élevée pour qu'il y ait réponse complète. Il a été montré que chez des poussins de 14 jours les dérivés de chitosane de haut PM ont eu un effet direct sur les lymphocytes en activant leur activité cellulaire. Le même phénomène a été observé chez des cellules de poulets adultes. Les macrophages sont probablement responsables de cette stimulation, comme chez la souris, même si les lymphocytes n'ont pas été conditionnés par des surnageants de macrophages. En effet, la préparation de lymphocytes contenait également des macrophages spléniques étant donné que la purification des lymphocytes n'était pas complète. L'étude des cytokines produites par les lymphocytes aviaires en réponse aux dérivés de chitosane a permis de montrer que la production d'INF- γ était stimulée par les dérivés de haut PM autant chez les poussins âgés de 14 jours que chez les poulets adultes. Cette augmentation d'INF- γ pourrait être causée par les effets des dérivés de chitosane sur les sous-populations lymphocytaires. En effet, il a été montré que les dérivés de chitosane de haut PM augmentaient les cellules CD4+CD8- et moins les cellules NK (CD3-CD8+) comparativement aux cellules contrôles. Donc, l'augmentation d'INF- γ détectée dans les surnageants de splénocytes pourrait provenir d'une hausse de ces populations cellulaires décrites comme d'importantes productrices d'INF- γ lors de la réponse inflammatoire. En effet, les cellules NK possèdent des récepteurs mannose et peuvent donc être directement activées par les dérivés de chitosane à produire de l'INF- γ (Weis *et al.*, 1998). Chez le poulet, la hausse d'INF- γ coïncide avec l'augmentation des cellules CD4-CD8+ et la baisse des CD4+CD8-, ce qui laisse croire que la production d'INF- γ proviendrait plutôt des lymphocytes T cytotoxiques activés par les macrophages présents dans la suspension de splénocytes au contact des dérivés de chitosane. Cette production accrue d'INF- γ explique également la stimulation de l'activité métabolique des splénocytes. En effet,

l'INF- γ est une cytokine pro-inflammatoire très importante dans l'activation des macrophages spléniques qui, une fois activés, produisent des cytokines agissant sur l'activation des lymphocytes. Ceci suggère donc que les dérivés de chitosane de haut PM ont des effets immunostimulants chez les oiseaux, d'une part en stimulant l'activité métabolique des lymphocytes, et en induisant la production d'INF- γ via une modulation des sous-populations lymphocytaires et des cellules NK. Toutefois, l'action immunostimulante des dérivés de chitosane dépend de l'état d'activation des cellules. En effets, alors que les dérivés de chitosane induisent la production d'INF- γ chez des splénocytes au repos, i.e. ne produisant théoriquement pas d'INF- γ , la production de cette cytokine est au contraire inhibée chez des splénocytes produisant de l'INF- γ dès le départ, donc dans un modèle voulant montrer ce qui se passe lorsque la réponse inflammatoire est déjà amorcée. De plus, cette inhibition d'INF- γ s'est produite alors que les niveaux de TGF- β 1, une cytokine anti-inflammatoire et antagoniste de l'INF- γ , ont légèrement augmenté. Les résultats suggèrent que les dérivés de chitosane de haut PM seraient immunomodulateurs, soit en stimulant la réponse inflammatoire des cellules au repos, ou en diminuant légèrement la réponse inflammatoire lorsque les cellules ont déjà été activées. Cette affirmation est appuyée par la diminution de l'activité métabolique des splénocytes en présence de LPS qui a été observée chez les poussins âgés de 14 jours.

4.4- Conclusions générales

Les résultats et les observations préliminaires présentés dans ce mémoire n'ont pas permis de conclure que le produit OligoviaTM de la compagnie ISM Biopolymer Inc. serait efficace dans le traitement de l'OA. Toutefois, certaines observations sur un petit nombre de souris, bien que non significatives, suggèrent que le produit pourrait avoir une certaine efficacité dans la résorption de l'enflure des tissus touchés, particulièrement en inhibant la production de la PGE₂ dans le liquide synovial, un important médiateur inflammatoire dans l'OA. Toutefois, de nouvelles expériences comprenant un plus grand échantillonnage sont nécessaires afin de déterminer si le produit OligoviaTM serait efficace dans le traitement de l'OA.

Les dérivés de chitosane de faible PM présentent aussi un potentiel intéressant contre les maladies inflammatoires en général grâce à leurs propriétés immunomodulatrices. Ainsi, la capacité des dérivés de chitosane à induire une réponse de type Th1 via l'activation des macrophages à produire du TNF- α et de L'IL-6 et l'activation des lymphocytes, offre une alternative pour le traitement de maladies immunosuppressives. Chez les personnes atteintes de telles maladies, les dérivés de chitosane pourraient favoriser des réactions inflammatoires susceptibles de les protéger contre des infections courantes. Inversement, les dérivés de chitosane pourraient être utilisés pour traiter des maladies caractérisées par une inflammation permanente, comme la maladie de Crohn, possiblement en inhibant l'activation des lymphocytes et ainsi limiter la production de cytokines inflammatoires. Par contre, l'utilisation des dérivés de chitosane ne saurait être recommandée pour des personnes souffrant d'obésité chez qui les dérivés de chitosane pourraient entraîner une augmentation des niveaux circulants de TNF- α et d'IL-6 par les adipocytes ce qui augmenterait les risques de maladies cardiovasculaires.

Les dérivés de chitosane de haut PM ont aussi montré des effets immunomodulateurs dans un modèle aviaire. Les effets immunostimulants de ces dérivés se sont manifestés par l'activation des splénocytes (lymphocytes, macrophages et cellules NK) et par la modulation des sous-populations, soit une hausse des CD4+CD8- et une baisse des CD4-CD8+ chez les poussins âgés de 14 jours. Un effet semblable a été observé chez les poulets adultes alors que la production d'INF- γ par ces lymphocytes ainsi que par les cellules NK était également augmentée par certains dérivés. Ces résultats ont montré que les dérivés de haut PM seraient intéressants dans la mesure où ils pourraient être utilisés pour stimuler l'immunisation de poussins dès l'âge de 14 jours. Les effets immunosuppresseurs des dérivés de chitosane de haut PM ne pourraient être exploités que pour diminuer une inflammation déjà installée. En effet, une diminution d'INF- γ accompagnée d'une très légère augmentation dans certains cas de TGF- β 1 n'est obtenue que lorsque les cellules sont déjà activées.

4.5- Développement futurs

Les résultats obtenus dans ce travail suggèrent que les dérivés de chitosane semblent posséder des propriétés anti-inflammatoires ou immunostimulantes, selon la nature du composé. Ainsi, il a été démontré à l'aide d'un modèle *in vitro* d'inflammation induit par le PEP que les lymphocytes activés sont sensibles aux effets des dérivés de chitosane qui ont inhibé l'activité métabolique des cellules à un niveau près de l'état de repos. Ces résultats suggèrent que les dérivés de chitosane sont des immunomodulateurs qui pourraient aussi bien être utilisés pour stimuler la réponse immunitaire de sujets affaiblis ou pour augmenter la réponse à des vaccins, que comme immunosuppresseurs dans le traitement de maladies caractérisées par un état d'inflammation permanent.

A la suite de ce mémoire, certains points à éclaircir subsistent afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires par lesquels les dérivés de chitosane modulent la réponse inflammatoire. L'identification des récepteurs mannose comme récepteurs pour les dérivés de chitosane ouvre une nouvelle voie dans la détermination des mécanismes d'interaction entre les molécules et les cellules inflammatoires, et l'identification de nouveaux récepteurs pourraient permettre d'explorer les voies de signalisation intracellulaire empruntées par les molécules de chitosane de toutes tailles.

Afin de démontrer le potentiel des dérivés de chitosane de haut PM en tant que supplément diététique dans la stimulation immunitaire du poulet en milieu industriel, des expériences effectuées sur les cellules du système immunitaire mucosal pourraient identifier de façon précise les mécanismes impliqués dans la modulation de l'inflammation par les dérivés, et par conséquent permettre de sélectionner les produits présentant la meilleure efficacité en fonction des effets recherchés.

5- RÉFÉRENCES

- ADAMS, D. O. et HAMILTON, T. A. 1984. The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.* **2**: 283-318.
- AGUET, M., DEMBIC, Z. et MERLIN, G. 1988. Molecular cloning and expression of the human interferon- γ -receptor. *Cell.* **55** : 273-280.
- AMIN, A. R. 1999. Regulation of tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor converting enzyme in human osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* **7**: 392-394.
- ANDERSON, J. W., NICOLOSI, R. J. et BORZELLECA, J. F. 2005. Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy. *Food Chem. Toxicol.* **43**: 187-201.
- ANDREASEN, S. O., CHRISTENSEN, J. E., MARKER, O. et THOMSEN, A. R. 2000. Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8⁺ effector T cell responses. *J. Immunol.* **164**: 3689-3697.
- AREND, W. P. et DAYER, J. M. 1995. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **38**: 151-160.
- ARSTILA, T. P. et LASSILA, O. 1993. Androgen-induced expansion of the peripheral blood T cell population in the chicken. *J. Immunol.* **151**: 6627-6633.
- ARSTILA, T. P., VAINIO, O. et LASSILA, O. 1994. Central role of CD4⁺ T cells in avian immune response. *Poult. Sci.* **73**: 1016-1019.
- BALDWIN Jr, A. S. 1996. The NF- κ B and I KappaB proteins: new discoveries and insights. *Ann. Rev. Immunol.* **14**: 649-683.
- BARCLAY, T. S., TSOUROUNIS, C. et McCART, G. M. 1998. Glucosamine. *Ann Pharmacother.* **32**: 574-579.
- BASSLEER, C., HENROTIN, Y. et FRANCHIMONT, P. 1992. In vitro evaluation of drugs proposed as chondroprotective agents. *Int. J. Tissue React.* **14**: 231-241.
- BAU, B. GEBHARD, P. M., HAAG, J., KNORR, T., BARTNIK, E. et AIGNER, T. 2002. Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthr. Rheum.* **46**: 2648-2657.

- BAUER, H., JUNG, T., TSIKAS, D., STICHTENOTH, D. O., FROLICH, J. C. et NEUMANN, C. 1997. Nitric oxide inhibits the secretion of T-helper 1- and T-helper 2-associated cytokines in activated human T cells. *Immunology* **90**: 205-211.
- BEFUS, A. D., JOHNSTON, N., LESLIE, G. A. et BIENENSTOCK, J. 1980. Gut associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny and some functional characteristics of Peyer's patches. *J. Immunol.* **125**: 2626-2632.
- BENITO, M. J., MURPHY, E., MURPHY, E. P., VAN DER BERG, W. B., FITZGERALD, O. et BRESNIHAN, B. 2004. Increased synovial tissue NF-kappa B1 expression at sites adjacent to the cartilage-pannus junction in rheumatoid arthritis. *Arthr. Rheum.* **50**: 1781-1787.
- BESSAY, M., LE VERN, Y., KERBOEUF, D., YVORE, P. et QUERE, P. 1996. Changes in intestinal intra-epithelial and systemic T-cell subpopulations after an *Eimeria* infection in chickens: comparative study between *E. acervulina* and *E. tenella*. *Vet. Res.* **27**: 503-514.
- BLOOM, D., JABRANE-FERRAT, N., ZENG, L., WU, A., LI, L., LO, D., TURCK, C. W., AN, S. et GOETZL, E. J. 1999. Prostaglandin E₂ enhancement of interferon- γ production by antigen-stimulated type 1 helper T cells. *Cell. Immunol.* **194**: 21-27.
- BOKMAN, D. E. et COOPER, M. D. 1973. Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix and Peyer's patches. An electron microscopic study. *Am. J. Anat.* **136**: 455-478.
- BOGDAN, C., VODOVOTZ, Y. et NATHAN, C. 1991. Macrophage deactivation by interleukin-10. *J. Exp. Med.* **174**: 1549-1555.
- BONNEY, R. J. et DAVIES, P. 1984. Possible autoregulatory functions of the secretory products of mononuclear phagocytes. *Contemp. Top. Immunobiol.* **14**: 199-223.
- BOZZA, M., BLISS, J. L., DORNER, A. J. et TREPICCHIO, W. L. 2001. Interleukin-11 modulates Th1/Th2 cytokine production from activated CD4⁺ T cells. *J. Interf. Cytok. Res.* **2**: 21-30.

- BRANDTZAEG, P., BALKIEN, K., BJERKE, K., ROGNUM, T. O., SCOTT, H. et VALNES, K. 1987. Nature and properties of the human gastrointestinal immune system. *Dans Immunology of the gastrointestinal tract. Éditeur: CRC Press Inc. Boca Raton, FL. pp: 1-85.*
- BREYER, R. M., BAGDASSARIAN, C. K., MYERS, S. A. et BREYER, M. D. 2001. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 41: 661-690.*
- BRUYERE, O., PAVELKA, K., ROVATI, L. C., DEROISY, R., OLEJAROVA, M., GATTEROVA, J., GIACOVELLI, G. et REGINSTER, J. Y. 2004. Glucosamine sulfate reduces osteoarthritis progression in postmenopausal women with knee osteoarthritis: evidence from two 3-year studies. *Menopause. 11: 138-143.*
- BUBZY, J. C. et ROBERTS, T. 1996. U.S. foodborne disease costs for seven pathogens. *Food Rev. 19: 20-25.*
- BÜTTNER, F. H., CHUBINSKAYA, S., MARGERIE, D., HUCH, K., FLECHTENMACHER, J. et COLE, A. A. 1997. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in human articular cartilage. *Arthr. Rheum. 40: 704-709.*
- CÀRCAMO, J., ZENTELLA, A. et MASSAGUÉ, J. 1995. Disruption of Transforming Growth Factor β signaling by a mutation that prevents transphosphorylation within the receptor complex. *Mol. Cell. Biol. 15: 1573-1581.*
- CARSON, W. E., LINDEMANN, M. J., BAIOCCHI, R., LINETT, M., TAN, J. C., CHOU, C. C., NARULA, S. et CALIGIURI, M. A. 1995. The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood 85: 3577-3585.*
- CHATELET, C., DAMOUR, O., DOMARD, A. 2001. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials 22: 261-268.*
- CHEN, W. F. et ZLOTNIK, A. 1991. IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J. Immunol. 147: 528-534.*

- CHEN, C. C., ROSENBLOOM, C. L., ANDERSON, D. C. et MANNING, A. M. 1995. Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of IkappaB-alpha phosphorylation. *J. Immunol.* **155**: 3538-3545.
- CHOI, K. D., LILLEHOJ, H. S. et ZARLENGA, D. S. 1999. Changes in local IFN- and TGF- β 4 mRNA expression and intraepithelial lymphocytes following *E. acervulina* infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **71**: 263-275.
- CHOU, T. C., FU, E. et SHEN, E. C. 2003. Chitosan inhibits prostaglandin E₂ formation and cyclooxygenase-2 induction in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**: 403-407.
- CHUN, K. H., KIM, B. Y. et HAHM, Y. T. 1999. Extension of tofu shelf-life with water soluble degraded chitosan as a coagulant. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**: 161-166.
- CHUNG, Y. C., SU, Y. P., CHEN, C. C., JIA, G., WANG, H. L., WU, J. C. et LIN, J. G. 2004. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta. Pharmacol. Sin.* **25**: 932-936.
- COFFMAN, R. L., SEYMOUR, B. W., LEBMAN, D. A., HIRAKI, D., CHRISTIANSEN, A., SHRADER, B., CHERWINSKI, H. M., SAVELKOUL, H. F., FINKELMAN, F. D., BOND, M. W. et MOSMANN, T. R. 1988. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol. Rev.* **102**: 5-28.
- COHEN, J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* **420**: 885-891.
- COLLISSON, E. W., PEI, J., DZIELAWA, J. et SEO, S. H. 2000. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. *Dev. Comp. Immunol.* **24**: 187-200.
- CROFFORD, L. J., WILDER, R. L., RISTIMAKI, A. P., SANO, H., REMMERS, E. F., EPPS, H. R. et HLA, T. 1994. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 β , phorbol ester, and corticosteroids. *J. Clin. Invest.* **93**: 1095-1101.

- CURAT, C. A., MIRANVILLE, A., SENGENES, C., DIEHL, M., TONUS, C., BUSSE, R. et BOULOUMIE, A. 2004. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*. **53**: 1285-1292.
- D'AMBROSIO, E., CASA, B., BOMPANI, R., SCALI, G. et SCALI, M. 1981. Glucosamine sulphate: a controlled clinical investigation in arthrosis. *Pharmatherapeutica*. **2**: 504-508.
- De CEUNINCK, F., DASSENCOURT, L. et ANRACT, P. 2004. The inflammatory side of human chondrocytes unveiled by antibody microarrays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**: 960-969.
- DEGEN, W. G., VAN DAAL, N., ROTHWELL, L., KAISER, P. et SCHIJNS, V. E. J. 2005. Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection on birds. *Vet. Microbiol.* **105**: 163-167.
- DEGEN, W. G., VAN DAAL, N., VAN ZUILEKOM, H. I., BURNSIDE, J. et SCHIJNS, V. E. 2004. Identification and molecular cloning of functional chicken IL-12. *J. Immunol.* **172**: 4371-4380.
- DELHASE, M., HAYAKAWA, M., CHEN, Y. et KARIN, M. 1999. Positive and negative regulation of I kappaB kinase activity through IKK subunit phosphorylation. *Science*. **284**: 309-313.
- DEL PRETE, G., De CARLI, M., ALMERIGOGNA, F., GIUDIZI, M. G., BIAGIOTTI, R. et ROMAGNANI, S. 1993. Human IL-10 produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J. Immunol.* **150**: 353-360.
- DE MAEYER, E. et DE MAEYER-GUIGNARD, J. 1992. Interferon- γ . *Curr. Opin. Immunol.* 1992. **4**: 321-326.
- DIETERT, R. R., GOLEMBOSKI, K. A., BLOOM, S. E. et QURESHI, M. A. 1991. The avian macrophages in cellular immunity. *Dans Avian Cell. Immunity. Éditeur: CRC Press. Boca Raton. FL. pp:71-95.*
- DING, L. et SHEVACH, E. M. 1992. IL-10 inhibits mitogen-induced T-cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory functions. *J. Immunol.* **148**: 3133-3139.

- DODELLER, F., SKAPENKO, A., KALDEN, J. R., LIPSKY, P. E. et SCHULZE-KOOPS, H. 2005. The p38 mitogen-activated protein kinase regulates effector functions of primary human CD4 T cells. *Eur. J. Immunol.* Sous presse.
- EWERS, C., JANSSEN, T. et WIELER, L. H. 2003. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. **116**: 381-395.
- FAGGIONI, R., JONES-CARSON, J., REED, D. A., DINARELLO, C. A., FEINGOLD, K. R. GRUNFELD, C. et FANTUZZI, G. 2000. Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 2367-2372.
- FAIN, J. N., MADAN, A. K., HILER, M. L., CHEEMA, P. et BAHOUTH, S. W. 2004. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology.* **145**: 2273-2282.
- FANTUZZI, G. et FAGGIONI, R. 2000. Leptin in the regulation of immunity, inflammation and hematopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* **68**: 437-446.
- FANTUZZI, G. 2005. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **115**: 911-9.
- FAROOQI, I. S., MATARESE, G., LORD, G. M. KEOGH, J. M., LAWRENCE, R. AGWU, C., SANNA, V., JEBB, S. A., PERNA, F., FONTANA, S., LECHLER, R. I., DEPAOLI, A. M. et O'RAHILLY, S. 2002. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin. Invest.* **110**: 1093-1103.
- FARRAR, M. A. et SCHREIBER, R. D. 1993. The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **11**: 571-611.
- FEIST, W., ULMER, A. J., MUSEHOLD, J., BRADE, H., KUSUMOTO, S. et FLAD, H. D. 1989. Induction of tumor necrosis factor-alpha release by lipopolysaccharide and defined lipopolysaccharide partial structures. *Immunobiology.* **179**: 293-307.
- FENG, J., ZHAO, L. et YU, Q. 2004. Receptor-mediated stimulatory effect of oligochitosan in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**: 414-420.

- FERNANDES, J. C., MARTEL-PELLETIER, J. et PELLETIER, J. P. 2002. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology*. **39**: 237-246.
- FIFE, R. S. 1997. Osteoarthritis: epidemiology, pathology, and pathogenesis, p. 216–217. *Dans Primer on the rheumatic diseases*. Éditeur: J. H. Klippel. Arthritis Foundation. Atlanta. GA.
- FIORENTINO, D. F., BOND, M. W. et MOSMANN, T.R. 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. exp. Med.* **170**: 2081-2095.
- FIORENTINO, D. F., ZLOTNIK, A., MOSMANN, T. R., HOWARD, M. et O’GARRA, A. 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* **147**: 3815-3822.
- FORCHHAMMER, L., THORN, M., MET, O., GAD, M., WEIDNER, M. S. et CLAESSION, M. H. 2003. Immunobiological effects of glucosamine in vitro. *Scand. J. Immunol.* **58**: 404-411.
- FRIEDMAN, J. M. et HALAAS, J. L. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**: 763-770.
- FYTILI, P., GIANNATOU, E., KARACHALIOS, T., MALIZOS, K. et TSEZOU, A. 2005. Interleukin-10G and interleukin-10R microsatellite polymorphisms and osteoarthritis of the knee. *Clin. Exp. Rheumatol.* **23**: 621-627.
- GLICK, B., CHANG, T. S. et JAAP, R. G. 1956. The bursa of Fabricius and antibody production in the domestic fowl. *Poult. Sci.* **35**: 224-225.
- GLICK, B., HOLBROOK, K. A., OLAH, I., PERKINS, W. D. et STINSON, R. 1981. An electron and light microscopy study of caecal tonsil, the basic unit of the caecal tonsil. *Dev. Comp. Immunol.* **5**: 95-104.
- GOETZL, E. J., AN, S. et SMITH, W. L. 1995. Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. *FASEB J.* **9**: 1051-1058.
- GOLEMBOSKI, K. A., BLOOM, S. E. et DIETERT, R. R. 1990. Dynamics of the avian inflammatory responses to crosslinked dextran: changes in avian blood leukocyte populations. *Inflammation* **14**: 31-40.

- GOLLOB, J. A., LI, J., REINHERZ, E. L. et RITZ, J. 1995. CD2 regulates responsiveness of activated T cells to interleukin-12. *J. Exp. Med.* **182**: 721-731.
- GOUZE, J. N., BIANCHI, A., BECUWE, P., DAUCA, M., NETTER, P., MAGDALOU, J., TERLAIN, B. et BORDJI, K. 2002. Glucosamine modulates IL-1-induced activation of rat chondrocytes at a receptor level, and by inhibiting the NF-kappa B pathway. *FEBS Lett.* **510**: 166-170.
- GUALILLO, O., EIRAS, S., LAGO, F., DIEGUEZ, C. et CASANUEVA, F. F. 2000. Elevated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation. *Life Sci.* **67**: 2433-2441.
- GUERNE, P. A., SUBLET, A. et LOTZ, M. 1994. Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes: distinct profiles in primary chondrocytes, subcultured chondrocytes, and fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **158**: 476-484.
- GUHA, M. et MACKMAN, N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* **13**: 85-94.
- HALPER, J., BURT, D. W. et ROMANOV, M. N. 2004. On reassessment of the chicken TGF- β_4 gene as TGF- β_1 . *Growth Factors.* **22**: 121-122.
- HAMBLETON, J., WEINSTEIN, S. L., LEM, L. et DEFRANCO, A. L. 1996. Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide stimulated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 2774-2778.
- HARIZI, H., JUZAN, M., GROSSET, C., RASHEDI, M. et GUALDE, N. 2001. Dendritic cells issued *in vitro* from bone marrow produce PGE(2) that contributes to the immunomodulation induced by antigen-presenting cells. *Cell. Immunol.* **209**: 19-28.
- HASSELBACHER, P. 1981. The structure of the synovial membrane. *Clin. Rheum. Dis.* **7**: 57-69.
- HAWKER, G. 1997. Update on the epidemiology of the rheumatic diseases. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2**: 90-94.
- HESSLE, C., HANSON, L. A. et WOLD, A. E. 2000. Interleukin-10 produced by the innate immune system masks *in vitro* evidence of acquired T-cell immunity to *E. coli*. *Scand. J. Immunol.* **52**: 13-20.

- HILKENS, C. M., SNIJDERS, A., SNIJDEWINT, F. G., WIERENGA, E. et KAPSENBERG, M. 1996. Modulation of T-cell cytokine secretion by accessory-cell-derived products. *Eur. Respir. J. Suppl.* **22**: 90s-94s.
- HINZ, B., BRUNE, K. et PAHL, A. 2000. Prostaglandin E(2) upregulates cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**: 744-748.
- HOWARD, J. K., LORD, G. M., MATARESE, G., VENDETTI, S., GHATEI, M. A., RITTER, M. A., LECHLER, R. I. et BLOOM, S. R. 1999. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J. Clin. Invest.* **104**: 1051-1059.
- HOWELL, D. S., PITA, J. C. et WOESSNER, J. F. 1982. Biochemical changes in cartilage relevant to the cause and management of osteoarthritis. *Rheumatology* **7**: 29-45.
- HUA, J., SUGURO, S., HIRANO, S., SAKAMOTO, K. et NAGAOKA, I. 2005. Preventive actions of a high dose of glucosamine on adjuvant arthritis in rats *Inflamm. Res.* **54**: 127-132.
- HYNES, R. O. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* **48**: 549-560.
- ISAACS, A. et LINDENMANN, J. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc. Royal Soc. London.* **147**: 258-267.
- JAKWAY, J. P., et DEFRANCO, A. L. 1986. Pertussis toxin inhibition of B cell and macrophage responses to bacterial lipopolysaccharide. *Science* **234**: 743-746.
- JEDYNAK, M. et SIEMIATKOWSKI, A. 2002. The role of monocytes/macrophages and their cytokines in the development of immunosuppression after severe injury. *Pol. Merkuriusz. Lek.* **13**: 238-241.
- JOHANNSEN, L. 1993. Biological properties of bacterial peptidoglycan. *APMIS.* **101**: 337-344.
- JOOSTEN, L. A., HEUVELMANS-JACOBS, M., LUBBERTS, E., VAN DE LOO, F. A., BAKKER, A.C., HELSEN, M. M., RICHARDS, C. D. et VAN DEN BERG, W. B. 2002. Local interleukin-12 gene transfer promotes conversion of an acute arthritis to a chronic destructive arthritis. *Arthr. Rheum.* **46**: 1379-1389.

- JOOSTEN, L. A., SMEETS, R. L., KOENDERS, M. L., VAN DEN BERSSELAAR, L. A., HELSEN, M. M., OPPERS-WALGREEN, B., LUBBERTS, E., IWAKURA, Y., VAN DE LOO, F. A. et VAN DEN BERG, W. B. 2004. Interleukin-18 promotes joint inflammation and induces interleukin-1-driven cartilage destruction. *Am. J. Pathol.* **165**: 959-967.
- JUGE-AUBRY, C. E., SOMM, E., GIUSTI, V., PERNIN, A., CHICHEPORTICHE, R., VERDUMO, C., ROHNER-JEANRENAUD, F., BURGER, D., DAYER, J. M. et MEIER, C. A. 2003. Adipose tissue is a major source of interleukin-1 receptor antagonist: upregulation in obesity and inflammation. *Diabetes* **52**: 1104-1110.
- JUNQUEIRA, C., CARNEIRO, J. Et KELLY, R. O. 1992. *Dans Connective tissue. Basic histology.* 7th ed. Éditeur: Norwalk CT: Appleton & Lange. pp:94-96.
- KAISER, M. G., WING, T. et LAMONT, S. J. 1998. Effect of genetics, vaccine dosage and postvaccination sampling interval on early antibody response to *Salmonella enteritidis* vaccine in broiler breeder chicks. *Poult. Sci.* **77**: 271-275.
- KIDD, M. T., QURESHI, M. A., FERKET, P. R. et THOMAS, L. 1994. Dietary zinc-methionine enhances mononuclear-phagocytic function in young turkeys. *Biol. Trace Element Res.* **42**: 217-229.
- KIYONO, H., MOSTELLER-BARNUM, L., PITTS, A., WILLIAMSON, S., MICHALEK, S., et MCGHEE, J. 1985. Isotype specific immunoregulation, *J. Exp. Med.* **161**: 731-747.
- KOBAYASHI, M., SQUIRES, G. R., MOUSA, A., TANZER, M., ZUKOR, D. J., ANTONIOU, J., FEIGE, A. R. et POOLE, A. R. 2005. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthr. Rheum.* **52**: 128-135.
- KOBAYASHI, M., WATANABE, T., SUZUKI, S. et SUZUKI, M. 1990. Effects of *N*-acetylchitohexaose against *Candida albicans* infection of tumor-bearing mice. *Microbiol. Immunol.* **34**: 413-426.
- KRAAN, T. C. T. M. V., BOEIJE, L. C. M. et SMEENK, R. J. T. 1995. Prostaglandin-E₂ is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J. Exp. Med.* **181**: 200-206.

- KRISTL, J., SMID-KORBAR, J., STRUE, E., SCHARA, M. et RUPPRECHT, H. 1993. Hydrocolloids and gels of chitosan as drug carriers. *Int. J. Pharm.* **99**: 13-19.
- LABELLE, C. et COLIN, P. 1985. Relationship between serotypes of *Salmonella* from hatcheries and rearing farms and those from processed poultry carcasses. *Brit. Poultry Sci.* **26**: 179-186.
- LANDMAN, R. E., PUDER, J. J., XIAO, E., FREDA, P. U., FERIN, M. et WARDLAW, S. L. 2003. Endotoxin stimulates leptin in the human and nonhuman primate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**: 1285-1291.
- LARGO, R., ALVAREZ-SORIA, M. A., DIEZ-ORTEGO, I., SANCHEZ-PERNAUTE, O., EGIDO, J. et HERRERO-BEAUMONT, G. 2003. Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkappaB activation in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* **11**: 290-298.
- LAWRENCE, T., GILROY, D. W. COLVILLE-NASH, P. R. et WILLOUGHBY, D. A. 2001. New role for NF- κ B in the resolution of inflammation. *Nat. Med.* **7**: 1291-1297.
- LEBMAN, D. A., NOMURA, D. Y., COFFMAN, R. L. et LEE, F. D. 1990. Molecular characterization of germ-line immunoglobulin A transcripts produced during Transforming Growth Factor type β -induced isotype switching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 3962-3966.
- LESSARD, M., HUTCHINGS, D. L. et SPENCER, J. L. 1995. Cell mediated and humoral immune responses in chickens infected with *S. typhimurium*. *Avian Dis.* **39**: 230-238.
- LEVY, Y., FERMAND, J.P. et BROUET, J.C. 1990. Differential effects of low and high concentrations of interleukin-6 on human B cells. *Eur. J. Immunol.* **20**: 2389-2393.
- LEWIS, C. E., RAMSHAW, A. L., LORENZEN, J. et McGEE, J. O. D. 1991. Basic fibroblast growth factor and interleukin 4 and 6 stimulate the release of INF- γ by individual NK cells. *Cell. Immunol.* **132**: 158-167.
- LILLEHOJ, H. S. 1994. Analysis of *Eimeria acervulina*-induced changes in the intestinal T lymphocyte subpopulations in two chicken strains showing different levels of susceptibility to coccidiosis. *Res. Vet. Sci.* **56**: 1-7.

- LILLEJOH, H. S. et TROUT, J. M. 1994. CD81 T cell coccidia interactions. *Parasitol. Today*. **10**: 10-14.
- LILLEJOH, H. S. et TROUT, J. M. 1996. Avian Gut-Associated Lymphoid tissues and Intestinal Immune Responses to *Eimeria* Parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* 349-360.
- LILLEHOJ, E. P., YUN, C. H. et LILLEHOJ, H. S. 2002. Vaccines against the avian enteropathogens *Eimeria*, *Cryptosporidium* and *Salmonella*. *Anim. Health Res. Rev.* **1**: 47-65.
- LANDMAN, R. E., PUDER, J. J., XIAO, E., FREDA, P. U., FERIN, M. et WARDLAW, S. L. 2003. Endotoxin stimulates leptin in the human and nonhuman primate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**: 1285-1291.
- LOFFREDA, S., YANG, S. Q., LIN, H. Z., KARP, C. L., BRENGMAN, M. L., WANG, D. J. et KLEIN, A. S. 1998. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J.* **12**: 57-63.
- LU, S., NISHIMURA, K., HOSSAIN, M. A. M. JISAKA, M., NAGAYA, T. et YOKOTA, K. 2004. Regulation and role of arachidonate cascade during changes in life cycle of adipocytes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **118**: 133-153.
- MALONEY, G. SCHRODER, M. et BOWIE, A. G. 2005. Vaccinia virus protein A52R activates p38 mitogen-activated protein kinase and potentiates lipopolysaccharide-induced interleukin-10. *J. Biol. Chem.* **280**: 30838-30844.
- MARONI, O., BENDINELLI, P. et PICCOLETTI, R. 2005. Intracellular signal transduction pathways induced by leptin in C2C12 cells. *Cell. Biol. Int.* **29**: 542-550.
- MARTEL-PELLETIER, J., ALAAEDDINE, N. et PELLETIER, J. P. 1999. Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Front. Biosci.* **4**: 694-703.
- MARTENS, E., DILLEN, C. et PUT, W. 1993. Increased circulating IL-6 activity in endotoxin challenged mice pretreated with anti-IL-6 antibody is due to IL-6 accumulation in antigen-antibody complexes. *Eur. J. Immunol.* **23**: 2026-2029.
- MARUNA, P., GURLICH, R. et FRASKO, R. 2001. Leptin- a new acute phase reactant. *Vnitr. Lek.* **47**: 478-483.

- MCCORMACK, W. T. et THOMPSON, C. B. 1990. Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light chain gene. *Adv. Immunol.* **48**: 41-67.
- Mc CUTCHEN, C. W. 1981. Joint lubrication. *Clin. Rheum. Dis.* **7**: 241-257.
- McDONALD, C., INOHARA, N. et NUNEZ, G. 2005. Peptidoglycan signaling in innate immunity and inflammatory disease. *J. Biol. Chem.* **280**: 20177-20180.
- McGHEE, J. R., MESTECKY, J. ELSON, C. O. et KIYONO, H. 1989. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J. Clin. Immunol.* **9**: 175-199.
- MEDANA, I. M., GALLIMORE, A., OXENIUS, A., MARTINIC, M. M., WEKERLE, H. et NEUMANN, H. 2000. MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8⁺ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway. *Eur. J. Immunol.* **30**: 3623-3633.
- MELCHIORRI, C., MELICONI, R., FRIZZIERO, L., SILVESTRI, T., PULSATELLI, L., MAZZETTI, I., BORZI, R. M., UGUCCIONI, M. et FACCHINI, A. 1998. Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthr. Rheum.* **41**: 2165-2174.
- METZGER, D.W., VOGEL, L.A., VAN CLEAVE, V.H., LESTER, T. L. et BUCHANAN, J. M. 1995. The effects of IL-12 on B cell subset function. *Res. Immunol.* **146**: 499-505.
- MI, F. L., WU, Y. B., SHYU, S. S., CHAO, A. C., LAI, J. Y. et SU, C. C. 2003. Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: a new type of wound dressing for controlled anti-bacterial release. *J. Memb. Sci.* **212**: 237-254.
- MILEWSKI, S. 2002. Glucosamine-6-phosphate synthase--the multi-facets enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* **1597**: 173-192.
- MIYAZONO, K., ICHIJO, H. Et HELDIN, C. H. 1993. Transforming Growth Factor- β : Latent forms, binding proteins and receptors. *Growth Factors.* **8**: 11-22.
- MORI, T., MURAKAMI, M., OKUMURA, M., KADOSAWA, T., UEDE, T. et FUJINAGA, T. 2005. Mechanism of macrophages activation by chitin derivates. *J. Vet. Med. Sci.* **67** :51-56.

- NANTEL, F., DENIS, D., GORDON, R. NORTHEY, A., CIRINO, M., METTERS, K. M. et CHAN, C. C. 1999. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **128**: 853-859.
- NIETFELD, J. J., WILBRINK, B., HELLE, M., VAN ROY, J. L., SWAAK, A. J. et HUBER-BRUNING, O. 1990. Interleukin-1-induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interleukin-1 in human articular cartilage. *Arthr. Rheum.* **33**: 16695-16701.
- NO, H. K., LEE, S. H., PARK, N. Y. et MEYERS, S. P. 2003. Comparison of physicochemical, binding, and antibacterial properties of chitosans prepared without and with deproteinization process. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 7659-7663.
- NOMURA, Y. 2001. NF- κ B activation and I kappaB alpha dynamism involved in iNOS and chemokine induction in astroglial cells. *Life Sci.* **68**: 1695-1701.
- OFEI, F., HUREL, S., NEWKIRK, J., SOPWITH, M. et TAYLOR, R. 1996. Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* **45** :881-885.
- OKADA, M., KITAHARA, M., KISHIMOTO, S., MATSUDA, T., HIRANO, T. et KISHIMOTO, T. 1988. IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. *J. Immunol.* **141**: 1543-1549.
- PALMOSKI, M. J. et BRANDT, K. D. 1980. Effects of some nonsteroidal antiinflammatory drugs on proteoglycan metabolism and organization in canine articular cartilage. *Arthritis Rheum.* **23**: 1010-1020.
- POOLE, A. R. et HOWELL, D. S. 2001. Etiopathogenesis of osteoarthritis. *Dans Osteoarthritis: Diagnosis/surgical management*. 3rd ed. *Éditeur*: Moskowitz, R. W. et al. Philadelphia. pp:29-47.
- PORPORATTO, C., BIANCO, I. D., CABANILLAS, A. M. et CORREA, S. G. 2004. Early events associated to the oral co-administration of type II collagen and chitosan: induction of anti-inflammatory cytokines. *Int. Immunol.* **16**: 433-441.
- PORPORATTO, C., BIANCO, I. D. et CORREA, S. G. 2005. Local and systemic activity of the polysaccharide chitosan at lymphoid tissues after oral administration. *J. Leukoc. Biol.* **78**: 62-69.

- POWWELS, M. J., JACOBS, J. R., SPAN, P. N., LUTTERMAN, J. A., SMITS, P. et TACK, C. J. 2001. Short-term glucosamine infusion does not affect insulin sensitivity in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**: 2099-2103.
- QURESHI, M. A., ALI, R. A. et HUNTER, R. L. 1995. Immunomodulatory effects of *Spirulina platensis* supplementation in chickens. *Dans Proceedings 44th Western Poultry Disease Conference*. Sacramento CA. pp:117-121.
- QURESHI, M. A., DIETERT, R. R. et BACON, L. D. 1986. Genetic variation in the recruitment and activation of chicken peritoneal macrophages. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **181**: 560-566.
- QURESHI, M. A., MARSH, A., DIETERT, R. R. SUNG, Y. J., C. NICHOLAS-BOLNET, C. et PETITTE, J. N. 1994. Profiles of chicken macrophage effector functions. *Poultry Sci.* **73**: 1027-1034.
- QURESHI, M. A. et MILLER, L. 1991. Signal requirements for the acquisition of tumoricidal competence by chicken peritoneal macrophages. *Poultry Sci.* **70**: 530-538.
- RAHIM, S. S., KHAN, N., BODDUPALLI, C. S., HASNAIN, S. E. et MUKHOPADHYAY, S. 2005. Interleukin-10 (IL-10) mediated suppression of IL-12 production in RAW 264.7 cells also involves c-rel transcription factor. *Immunology.* **114**: 313-321.
- RANGES, G. E., ZLOTNIK, A., ESPEVIK, T., DINARELLO, C. A., CERAMI, A. et PALLADINO, M. A. Jr. 1988. Tumor necrosis factor alpha/cachectin is a growth factor for thymocytes. Synergistic interactions with other cytokines. *J. Exp. Med.* **167**: 1472-1478.
- REGINSTER, J.Y., DEROISY, R., ROVATI, L.C., LEE, R.L., LEJEUNE, E., BRUYERE, O., GIACOVELLI, G., HENROTIN, Y. DACRE, J.E. et GOSSETT, C. 2001. Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Lancet* **357**: 251-256.
- RICHARDS, D. F., FERNANDEZ, M., CAULFIELD, J. et HAWRYLOWICZ, C. M. 2000. Glucocorticoids drive human CD8(+) T cell differentiation towards a phenotype with high IL-10 and reduced IL-4, IL-5 and IL-13 production. *Eur. J. Immunol.* **30**: 2344-2354.

- RICHY, F., BRUYERE, O., ETHGEN, O., CUCHERAT, M., HENROTIN, Y. et REGINSTER, J. Y. 2003. Structural and symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis: a comprehensive meta-analysis. *Arch. Intern. Med.* **163**: 1514-1522.
- RIYANA, N., KURREEMAN, F. A., HUIZINGA, T. W., DEKKER, T. W., STOOKEN-RIJSBERGEN, G. et KLOPPENBURG, M. 2005. The role of interleukin- 10 promotor polymorphisms in the susceptibility of distal interphalangeal osteoarthritis. *J. Rheumatol.* **32**: 1571-1575.
- ROBINSON, M. J. et COBB, M. H. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**: 180-186.
- RUDDLE, N. H. 1999. Lymphoid neo-organogenesis: lymphotoxin's role in inflammation and development. *Immunol. Res.* **19**: 119-125.
- SAKKAS, L. I., SCANZELLO, C., JOHANSON, N., BURKHOLDER, J., MITRA, A., SALGAME, P., KATSETOS, C. D. et PLATSOUKAS, C. D. 1998. T cells and T-cell cytokine transcripts in the synovial membrane in patients with osteoarthritis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **5**: 430-437.
- SANTANA-SABAGUN, E. et WEISMAN, H. M. 2001. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Dans Kelly's textbook of rheumatology. Vol. 1. Éditeur: W.B. Saunders Company. Philadephia. pp: 799-822.*
- SAYEGH, C. E., DEMARIES, S. L., PIKE, K. A., FRIEDMAN, J. E. et RATCLIFFE, M. J. H. 2000. The chicken B-cell receptor complex and its role in avian B-cell development. *Immunol. Rev.* **175**: 187-200.
- SCHAEFER, A. E., SCAFURI, A. R., FREDERICKSEN, T. L. et GILMOUR, D. G. 1985. Strong suppression by monocytes of T cell mitogenesis in chickens peripheral blood leukocytes. *J. Immunol.* **135**: 1653-1659.
- SCHUMACHER, H. R. 1969. The microvasculature of the synovial membrane of the monkey. *Arthr. Rheum.* **12**: 387-404.
- SCROGGIE, D. A., ALBRIGHT, A. et HARRIS, M. D. 2003. The effect of glucosamine-chondroitin supplementation on glycosylated hemoglobin levels in patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized clinical trial. *Arch. Intern. Med.* **163**: 1587-1590.

- SECKINGER, P., ZHANG, J. H., HAUPTMANN, B. et DAYER, J. M. 1990. Characterization of a tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) inhibitor: evidence of immunological cross-reactivity with the TNF receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**: 5188-5192.
- SENEL, S., KREMER, M. J., KAS, S., WERTZ, P. W., HINCAL, A. A et SQUIER, C. A. 2000. Enhancing effect of chitosan on peptide drug delivery across buccal mucosa. Biomaterials **21**: 2067-2071.
- SENEL, S. et McCLURE, S. J. 2004. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. Adv. Drug Deliv. Rev. **56**: 1467-1480.
- SETNIKAR, I., PACINI, M. A. et REVEL, L. 1991. Antiarthritic effects of glucosamine sulfate studied in animal models. Arzneimittelforschung **41**: 542-545.
- SETNIKAR, I. et ROVATI, L. C. 2001. Absorption, distribution, metabolism and excretion of glucosamine sulfate. A review. Arzneimittelforschung **51**: 699-725.
- SHARMA, J. 1999. Introduction to poultry vaccines and immunity. Adv. Vet. Med. **41**: 481-494.
- SHIGEMASA, Y. et MINAMI, S. 1995. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. Biotech. Genetic Eng. Rev. **13**: 383-420.
- SHIMAZU, R., AKASHI, S., OGATA, H., NAGAI, Y., FUKUDOME, K., MIYAKE, K. et KIMOTO, M. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. J. Exp. Med. **189**: 1777-1782.
- SHIRAI, A., HOLMES, K. et KLINMAN, D. 1993. Detection and quantification of cells secreting IL-6 under physiologic condition in Balb/c mice. J. Immunol. **150**: 793-799.
- SHON, Y. H., PARK, I. K., MOON, I. S., CHANG, H. W., PARK, I. K. et NAM, K. S. 2002. Effects of chitosan oligosaccharide on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced oxidative stress in mice. Biol. Pharm. Bull. **25**: 1161-1164.
- SHU, U., KINIWA, M., WU, C. Y., MALISZEWSKI, C., VEZZIO, N., HAKIMI, J., GATELY, M. et DELESPESE, G. 1995. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. Eur. J. Immunol. **25**: 1125-1128.

- SILVESTRI, T., PULSATELLI, L., DOLZANI, P., FRIZZIERO, L., FACCHINI, A. et MELICONI, R. 2005. In vivo expression of inflammatory cytokine receptors in the joint compartments of patients with arthritis. *Rheumatol. Int.* Sous presse.
- SIMS, J.E., MARCH, C. J., COSMAN, D., WIDMER, M. B., MACDONALD, H. R., MCMAHAN, C. J., GRUBIN, C. E., WIGNALL, J. M., JACKSON, J. L. et CALL, S. M. 1988. cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* **241**: 585-589.
- SINGLA, A. K. et CHAWLA, M. 2001. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects-an update. *J. Pharm. Pharmacol.* **53** : 1047-1067.
- SORNASSE, T., LARENAS, P. V., DAVIS, K. A., De VRIES, J. E. et YSSEL, H. 1996. Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level. *J. Exp. Med.* **184**: 473-483.
- SPRIGGS, D. R., IMAMURA, K., RODRIGUEZ, C., SARIBAN, E. et KUFEL, D. W. 1988. Tumor necrosis factor expression in human epithelial tumor cell lines. *J. Clin. Invest.* **81**: 455-460.
- STAEHEL, P., PUEHLER, F., SCHNEIDER, K., GOBEL, T. W. et KASPERS, B. 2001. Cytokines of birds: conserved functions- a largely different look. *J. Interf. Cyt. Res.* **21**: 993-1010.
- STAMENKOVIC, I., STEGAGNO, M., WRIGHT, K. A., KRANE, S. M., AMENTO, E. P., COLVIN, R. B., DUQUESNOY, R. J. et KURNICK, J. T. 1988. Clonal dominance among T-lymphocyte infiltrates in arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 1179-1183.
- SUNG, Y. J., HOTCHKISS, H., AUSTIC, R. E. et DIETERT, R. R. 1991. L-arginine-dependent production of a reactive nitrogen intermediate by macrophages of a uricotelic species. *J. Leuk. Biol.* **51**: 49-56.
- SWIHART, K., FRUTH, U., MESSMER, N., HUG, K., BEHIN, R., HUANG, S., DEL GUIDICE, G., AGUET, M. et LOUIS, J.A. 1995. Mice from a genetically resistant background lacking the interferon- γ receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4+ T cell response. *J. Exp. Med.* **181**: 961-971.

- TANNIS, A. J., BARBAN, J et CONQUER, J. A. 2004. Effect of glucosamine supplementation on fasting and non-fasting plasma glucose and serum insulin concentrations in healthy individuals. *Osteoarthritis Cartilage* **1**: 506-511.
- TARTAGLIA, L. A., WEBER, R. F., FIGARI, I. S., REYNOLDS, C., PALLADINO, M. A. Jr. et GOEDDEL, D. V. 1991. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**: 9292-9296.
- TRAVASSOS, L. H., GIRARDIN, S. E., PHILPOTT, D. J., BLANOT, D., NAHORI, M. A., WERTS, C. et BONECA, I. G. 2004. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.* **5**: 1000-1006.
- TREISMAN, R. 1996. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**: 205-215.
- UENO, H. MORI, T. et FUJINAGA, T. 2001. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **52**: 105-115.
- UENO, H., NAKAMURA, F., MURAKAMI, M., OKUMARA, M., KADOSAWA, T. et FUJINAG, T. 2001. Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages. *Biomaterials* **22**: 2125-2130.
- ULDRY, M., IBBERSON, M. HOSOKAWA, M. et THORENS, B. 2002. GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett.* **524**: 199-203.
- ULEVITCH, R. J. et TOBIAS, P. S. 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* **13**: 437-457.
- UNANUE, E. R., et ALLEN, P. M., 1987. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* **236**: 551-557.
- VACHOUD, L., ZYDOWICZ, N. et DORMARD, A. 2000. Physicochemical behaviour of chitin gels. *Carbohydr. Res.* **326**: 295-304.
- VAINIO, O., PECK, R., KOCH, C. et TOIVANEN, A. 1983. Origin of peripheral blood macrophages in bursa-cell-reconstituted chickens. *Scand. J. Immunol.* **17**: 193-199.

- VANDENABEELE, P. DECLERCQ, W., BEYAERT, R. et FIERS, W. 1995. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell. Biol.* **5**: 392-399.
- VANE, J. R., MITCHELL, J. A., APPLETON, I., TOMLINSON, A., BISHOP-BAILEY, D., CROXTALL, J. et WILLOUGHBY, D. A. 1994. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 2046-2050.
- VAN ROON, J. A., VAN ROY, J. L., GMELIG-MEYLING, F. H., LAFEBER, F. P. et BIJLSMA, J.W. 1996. Prevention and reversal of cartilage degradation in rheumatoid arthritis by interleukin-10 and interleukin-4. *Arthritis Rheum.* **39**: 829-835.
- VAN SNICK, J. 1990. Interleukin-6: an overview. *Annu. Rev. Immunol.* **8**: 113-118.
- VEGAD, J. L. et KATIYAR, A. K. 1995. The acute inflammatory response in the chicken. *Vet. Bull.* **65**: 399-409.
- VERGNE-SALLE, P. LEGER, D. Y., BERTIN, P., TREVES, R., BENEYTOUT, J. L. et LIAGRE, B. 2005. Effects of the active metabolite of leflunomide, A77 1726, on cytokine release and the MAPK signalling pathway in human rheumatoid arthritis synoviocytes. *Cytokine* **31**: 335-348.
- VERVELDE, L. et JEURISSEN, S. H. 1995. The role of intra-epithelial and lamina propria leucocytes during infection with *Eimeria tenella*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **371**: 953-958.
- WALDROUP, A. L. 1996. Contamination of raw poultry with pathogens. *World's Poultry Sci.* **59**: 5-25.
- WALLACH, D., ARUMUGAM, T. U., BOLDIN, M. P., CANTARELLA, G., GANESH, K. A., GOLTSEV, Y., GONCHAROV, T. M., KOVALENKO, A. V., RAJPUT, A., VARFOLOMEEV, E. E. et ZHANG, S. Q. 2002. How are the regulators regulated? The search for mechanisms that impose specificity on induction of cell death and NF- κ B activation by members of the TNF/NGF receptor family. *Arth. Res.* **4**: 189-196.

- WANG, X., LIANG, J., KOIKE, T., SUN, H., ICHIKAWA, T., KITAJIMA, S., MORIMOTO, M., SHIKAMA, H., WATANABE, T., SASAGURI, Y. et FAN, J. 2004. Overexpression of human matrix metalloproteinase-12 enhances the development of inflammatory arthritis in transgenic rabbits. *Am. J. Pathol.* **165**: 1375-1383.
- WARD, C., MURRAY, J., CLUGSTONE, A., DRANSFIELD, I., HASLETT, C. et ROSSI, A. G. 2005. Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and extracellular signal-regulated kinase activation in human neutrophils. *Eur. J. Immunol.* **35**: 2728-2737.
- WEIGERT, C., FRIESS, U., BRODBECK, K., HARING, H. U. et SCHLEICHER, E. D. 2003. Glutamine:fructose-6-phosphate aminotransferase enzyme activity is necessary for the induction of TGF-beta1 and fibronectin expression in mesangial cells. *Diabetologia* **46**: 852-855.
- WEILL, J. et REYNAUD, C. 1987. The chicken B cell compartment. *Science* **238**: 1094-1098.
- WEIS, W. I., TAYLOR, M. E. et DRICKAMER, K. 1998. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol.Rev.* **163**: 19-34.
- WEISBERG, S. P., McCANN, D., DESAI, M., ROSENBAUM, M., LEIBEL, R. L. et FERRANTE Jr, A. W. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**: 1796-1808.
- WELLS, L., VOSSELLER, K. et HART, G. W. 2003. A role for N-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance. *Cell Mol. Life Sci.* **60**: 222-228.
- WESTACOTT, C. I. et SHARIF, M. 1996. Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? *Semin. Arthritis Rheum.* **25**: 254-272.
- WILSON, H. M., CHETTIBI, S., JOBIN, C., WALBAUM, D., REES, A. J. et KLUTH, D. C. 2005. Inhibition of macrophage nuclear factor-kappaB leads to a dominant anti-inflammatory phenotype that attenuates glomerular inflammation in vivo. *Am. J. Pathol.* **167**: 27-37.
- WOLF, S. F., SIEBURTH, D. et SYPEK, J. 1994. Interleukin-12: a key modulator of immune function. *Stem Cells.* **12**: 154-168.

- WULSTER-RADCLIFFE, M. C., AJUWON, K. M., WANG, J., CHRISTIAN, J. A. et SPURLOCK, M. E. 2004. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**: 924-929.
- YAMASAKI, K., TAGA, T., HIRATA, Y., YAWATA, H., KAWANISHI, Y., SEED, B., TANIGUCHI, T., HIRANO, T. et KISHIMOTO, T. 1988. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science* **241**: 825-828.
- YOMOTA, C., KOMURO, T. et KIMARU, T. 1990. Studies on the degradation of chitosan films by lysozyme and release of loaded chemicals. *Yakugaku Zasshi* **110**: 442-448.
- YOUNG, H.A. et HARDY, K.J. 1990. Interferon γ : producer cells, activation stimuli, and molecular genetic regulation. *Pharmac. Ther.* **45**: 137-151.
- YOUNG, L., KATRIB, A, CUELLO, V., VOLLMER-CONNA, U. BERTOUCHE, J. V., ROBERTS-THOMSON, P. J., AHMED, M. J., SMITH, M. D. et YOUSSEF, P. P. 2001. Effects of intraarticular glucocorticoids on macrophage infiltration and mediators of joint damage in osteoarthritis synovial membranes: findings in a double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum.* **44**: 343-350.
- YU, Z., ZHAO, L. et KE, H. 2004. Potential role of nuclear factor-kappaB in the induction of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha by oligochitosan in macrophages. *Int. Immunopharmacol.* **4**: 193-200.
- YUN, C. H., LILLEHOJ, H. S. et LILLEHOJ, E. P. 2000. Intestinal immune responses to coccidiosis. *Dev. Comp. Immunol.* **24**: 303-324.
- ZHANG, F., BASINSKI, M. B., BEALS, J. M., BRIGGS, S. L., CHURGAY, L. M., CLAWSON, D. K., DIMARCHI, R. D., FURMAN, T. C., HALE, J. E. HSIUNG, H. R. W. 1997. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* **387**:206-208.
- ZHANG, P., MARTIN, M., MICHALEK, S. M. et KATZ, J. 2005. Role of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB in the regulation of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines by *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin B. *Infect. Immun.* **73**: 3990-3998.

- ZHANG, G. X., YU, S., GRAN, B. et ROSTAMI, A. 2005. Glucosamine abrogates the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis by induction of Th2 response. *J. Immunol.* **175**: 7202-7208.
- ZOLA, H, et NIKOLOUTSOPOULOS, A. 1989. Effect of recombinant human tumor necrosis factor beta on activation, proliferation, and differentiation of human B lymphocytes. *Immunology* **67**: 231-236.
- ZUCKERMAN, S. H., EVANS, G. F., SNYDER, Y. M. et ROEDER, W. D. 1989. Endotoxin-macrophage interaction posttranscriptional regulation of tumor necrosis factor expression. *J. Immunol.* **143**: 1223-1227.