



TLEMCEM

Numéro d'ordre : _____

UNIVERSITE DE TLEMCEM – ABOU-BEKR BELKAÏD

FACULTE SNV-STU - DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEE ET IMMUNOLOGIE

- BIOMOLIM-

MEMOIRE

Présenté pour obtention du grade

Master en Sciences Biologiques

Spécialité Immunologie

Par :

SAHI Amani Lamis

Soutenu le 25 JUIN 2023

Thème:

Effet adjuvant de la bromélaïne sur le potentiel REDOX des cellules mononucléées du sang périphérique traitées par le BCG

————— **Sous la direction du Professeur Mourad ARIBI** —————

Jury

Pr. Ismat SMAHI	Professeur	Université de Tlemcen, Algérie	President
Pr. Mourad ARIBI	Professeur	Université de Tlemcen, Algérie	Directeur de thèse
Dr. Wafa NOUARI	MCB	Université de Tlemcen, Algérie	Examineur
Dr. Maroua MILIANI	MCB	Université de Tlemcen, Algérie	Examineur

25 Juin, 2023

Remerciements

A l'occasion de la soutenance de mes travaux de mon projet de master immunologie, je tiens à exprimer toute ma gratitude envers tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Un grand merci à mon encadrant professeur Mourad Aribi, Directeur du laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie (BIMOLIM), code W0414100, et Université de Tlemcen, de m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail de Master en Immunologie, et de m'avoir accueilli dans son laboratoire, ainsi que pour toutes les connaissances et les conseils qu'il m'a transmis. Que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

J'exprime ma sincère reconnaissance à toute l'équipe de formation d'immunologie, à mes collègues avec qui j'ai travaillé, à mes enseignants pendant tout mon cursus ainsi qu'aux membres du laboratoire BIMOLIM et particulièrement aux doctorantes BENRRADJ Houria, BENAMAR Soumiya et ZOUDJI Souad pour leur aide et soutien un grand merci à madame DAHOU Sara pour tous ces efforts et son aide.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à l'ingénieur du laboratoire madame MESSALI Rabia pour son aide précieuse et son soutien. Et bien sûr à Kawther, Rahma et Zineb avec qui j'ai partagé tous ces derniers mois.

Je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents, qui m'ont soutenu tout au long des études sans eux je ne serai jamais arrivé où j'en suis.

Ma très chère sœur Rania, mon beau-frère Ismat et mes frères Nazih et Rassim, ainsi que mes amies Hadjar, Hanaa et Dalal qui m'ont encouragé et aidé moralement et ma très chère grand-mère mima Latefa.

Mon fiancé Mehdi qui m'a aidé et soutenu pendant mes études et m'a supporté dans les moments les plus difficile.

Tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont aidé à atteindre cet objectif.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	VII
LISTES DES FIGURES	VIII
LISTE DES TABLEAUX	IX
INTRODUCTION	1
I. REVUE DE LA LITTERATURE	2
I.1. VACCINOLOGIE	2
I.2. HISTOIRE DE LA VACCINATION	3
I.2.1. LA VACCINATION JENNERIENNE	3
<i>I.2.1.1. Mécanisme immunitaire de la vaccination jennérienne</i>	3
I.2.2. EVOLUTION DU CONCEPT DE LA PREVENTION DES MALADIES INFECTIEUSES	3
<i>I.2.2.1. Pasteur invente l'atténuation des vaccins</i>	4
I.2.3. IMMUNITE ACTIVE ET IMMUNITE PASSIVE	4
I.2.4. VACCINATION VERSUS SEROTHERAPIE	4
I.3. ADJUVANTS	5
I.3.1. DEFINITION	5
I.3.2. MECANISME D'ACTION	5
I.3.4. LES PRINCIPAUX ADJUVANTS UTILISES	7
I.4. BACILLE CALMETTE GUERIN (BCG)	8
I.4.1. HISTOIRE	8
I.4.2. DEFINITION ET FABRICATION	9
I.4.3. BCG ET ADJUVANT	9
I.4.4. MODE D'ACTION	10
<i>I.4.4.1. Effet du BCG</i>	10
I.4.5. LIMITES D'UTILISATION DU BCG	11
I.4.6. LE POTENTIEL REDOX	12
I.4.6.1. LE STRESS OXYDATIF	12
I.4.6.2. LES ANTIOXYDANTS	12
I.5. BROMELAINE	13
I.5.1. DEFINITION	13
I.5.2. CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES	13
I.5.3. APPLICATION CLINIQUE	14
<i>I.5.3.1. Effet Immunomodulateur de la bromélaïne</i>	14
I.5.4. LES AVANTAGES DE LA BROMELAÏNE	15
I.6. PROBLEMATIQUE ET TEST D'HYPOTHESE	16
II. MATERIEL ET METHODES	17
III. INTERPRETATION DES RESULTATS	18
IV. DISCUSSION :	19
V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	20
REFERENCES	21

RESUME

Introduction : La bromélaïne a été récemment observée comme pouvant avoir un effet adjuvant remarquable dans les préparations vaccinales. Néanmoins, les adjuvants pourraient altérer la protection cellulaire par exacerbation des effets vaccinaux sur les cellules immunitaires. Dans cette optique, nous avons évalué l'effet de la bromélaïne sur le potentiel redox des cellules mononucléées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs), traités par le BCG.

Matériel et Méthodes : Les PBMCs ont été isolées à partir du sang périphérique de donneurs sains. Le potentiel redox a été évalué par la mesure des biomarqueurs cellulaires de l'activité de la catalase (CAT), des niveaux de l'albumine endocytaire (AE), et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) des PBMC mises en culture.

Résultats : Confidentiel.

Conclusions : La bromélaïne exerce un effet protecteur important du potentiel redox des PBMCs traitées par le BCG.

Mots clés : BCG, bromélaïne, PBMC, potentiel redox, protection cellulaire, vaccin

ABSTRACT

Background: Bromelain has recently been observed as being able to have a remarkable adjuvant effect in vaccine preparations. Nevertheless, adjuvants could alter cellular protection by exacerbating vaccine effects on immune cells. In this perspective, we evaluated the effect of bromelain on the redox potential of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), treated with BCG.

Material And Methods: PBMCs were isolated from peripheral blood of healthy donors. Redox potential was assessed by measuring cellular biomarkers of catalase activity (CAT), endocytic albumin (AE) levels, and hydrogen peroxide (H₂O₂) of cultured PBMCs.

Results: Confidential.

Conclusion: Bromelain exerts a significant protective effect on the redox potential of PBMCs treated with BCG.

Key words: BCG, bromelaine, PBMC, redox potentiel, cellular protection, vaccin

ملخص

مقدمة: لوحظ مؤخرًا أن البروميلين له تأثير مساعد ملحوظ في مستحضرات اللقاح. ومع ذلك، يمكن أن تغير المواد المساعدة الحماية الخلوية عن طريق تفاقم تأثيرات اللقاح على الخلايا المناعية. في هذا المنظور، قمنا بتقييم تأثير البروميلين على إمكانات الأكسدة والاختزال للخلايا أحادية النواة في الدم المحيطي (الخلايا أحادية النواة في الدم المحيطي PBMC)، التي عولجت بـ BCG.

المواد والطرق: تم عزل من الدم المحيطي للمتبرعين الأصحاء. تم تقييم إمكانات الأكسدة والاختزال عن طريق قياس المؤشرات الحيوية الخلوية لنشاط الكاتلاز ومستويات الألبومين الداخلية و H_2O_2 للخلايا أحادية النواة في الدم المحيطي المستزرعة.

النتائج:

الاستنتاجات: يمارس البروميلين تأثيرًا وقائيًا كبيرًا على إمكانات الأكسدة والاختزال لـ PBMC المعالجة بـ BCG.

الكلمات المفتاحية: البروميلين، إمكانات الأكسدة والاختزال، حماية الخلايا، اللقاح BCG، الخلايا أحادية النواة في الدم المحيطي.

Liste des Abréviations

A

AE · l'albumine endocytaire
Ag · antigène

B

BCG · Bacille Calmette-Guérin
BCR · récepteur des cellules B
BK · bacilles de Koch

C

CAT · la catalase
CD · *clusters de différenciation*
CLR · C type-lectin receptors
CMH · *complexe majeur d'histocompatibilité*
CMI · la réponse immunitaire à médiation cellulaire
CPA · cellules présentatrices d'antigènes
CpG · cytosine phospho-guanin

H

H₂O₂ · Le peroxyde d'hydrogène

I

IL · *interleukine*
INF · interféron

M

M. Tuberculosis · Mycobacterium tuberculosis
MTB · Mycobacterium tuberculosis

N

NLR · NOD-like receptors

O

OMS · l'Organisation mondiale de la santé

P

PAMPs · Pathogen-associated molecular patterns
PBMCs · cellules mononuclées périphériques
PM · *poids moléculaire*
PNH · primates non humains

R

ROS · espèces réactives à l'oxygène

T

TB · La tuberculose, La tuberculose
TCR · *récepteur des cellules T*
TLR · Toll-like receptors
TNF · *facteur de nécrose tumorale*

Listes des figures

FIGURE 1.1. L'EXPERIENCE D'EDWARD JENNER	3
FIGURE 1.2. L'EXPERIENCE DE PASTEUR	4
FIGURE 1.3. MECANISME D'ACTION DE L'ADJUVANT (AWATE, BABIUK, ET MUTWIRI 2013)	6
FIGURE 1.4. LES CRITERES POUR LE CHOIX D'UN ADJUVANT	7
FIGURE 1.5. LES PRINCIPAUX ADJUVANTS UTILISES	8
FIGURE 1.6. MODE D'ACTION DU VACCIN BCG (COVIAN ET AL. 2019)	11
FIGURE 1.7. LES CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES DE LA BROMELAINE	14

Liste des tableaux

TABLEAU 1.1. LES DIFFERENTS TYPES DE VACCIN.....	2
TABLEAU 1.2. COMPARAISON ENTRE LA VACCINATION ET LA SEROTHERAPIE	5
TABLEAU 1.3. LES ADJUVANTS UTILISES DANS LE VACCIN BCG.....	9

Introduction

La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse causée par *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) et elle représente une menace persistante de la santé publique vu sa pathogénicité qui repose principalement sur (1) la capacité du bacille à reprogrammer les macrophages de l'hôte après une primo-infection, empêchant sa propre élimination ; (2) la formation de granulomes, dans lesquels le pathogène survit en équilibre avec la défense de l'hôte et (3) le ralentissement du contrôle du métabolisme central bactérien et de la réplication, caractérisant l'état dit dormant dans lequel le MTB résiste aux défenses de l'hôte et à la thérapie (Miggiano, Rizzi, et Ferraris 2020).

Une mycobactérie vivante atténuée connue sous le nom de Bacille Calmette-Guérin (BCG), dérivée de l'agent causal de la tuberculose bovine, *Mycobacterium bovis*, est utilisé en clinique comme vaccin (Ne et She 2018). Le BCG protège partiellement contre la tuberculose et a des effets immunostimulateurs qui réduisent la mortalité générale au cours des premières années de la vie en améliorant les réponses à TB ainsi qu'à d'autres telles que Il réduit en effet le risque de lèpre et l'ulcère de Buruli (Kandasamy et al. 2016) (Gagneux-Brunon et Botelho-Nevers 2022). Cependant, il a une efficacité variable et ne peut pas complètement prévenir l'infection et la transmission de TB.

L'objectif clé de la vaccination est l'induction d'une réponse immunitaire efficace spécifique à l'agent pathogène qui conduit à une protection contre l'infection et/ou la maladie causée par ce dernier. La réponse immunitaire aux antigènes pathogènes peut être améliorée par l'ajout d'agent immunostimulateur appelé adjuvant.

La capacité à moduler les réponses immunitaires est un objectif majeur de nombreux programmes de développement de vaccins. La bromélaïne est une enzyme protéolytique dérivée de la partie de la tige et du fruit de l'ananas (*Ananas comosus*). Elle fait partie de la famille des *broméliacées*, elle est impliquée dans la modulation des réponses immunitaires lors des allergies, l'inflammation, les brûlures, la coagulation sanguine, l'amélioration de l'action antibiotique, et le cancer (Chandwani et al. 2022). De ce fait elle est proposée pour une utilisation clinique (Engwerda et al. 2001).

La capacité antioxydante collective de l'hôte est maintenue par de nombreuses molécules protéiques et non protéiques intracellulaires et circulantes, qui empêchent les dommages oxydatifs des lipides, des protéines et des acides nucléiques. Le groupe d'antioxydants protéiques qui détoxifient les radicaux libres. Dans cette optique, nous avons étudié pour la première fois, l'effet adjuvant de la bromélaïne sur le potentiel REDOX des cellules mononuclées périphériques (PBMCs) traitées par le BCG.

I. Revue de la littérature

I.1. Vaccinologie

La vaccinologie est définie comme la science des vaccins. Ces derniers sont des produits biologiques qui peuvent être utilisés pour induire en toute sécurité une réponse immunitaire qui confère une protection contre une infection et/ou une maladie lors d'une exposition ultérieure à un agent pathogène (Pollard et Bijker 2021), et elle comprend la science fondamentale, les immunogènes, la réponse immunitaire de l'hôte, les stratégies et technologies d'administration, la fabrication et l'évaluation clinique.

La vaccinologie cible généralement les maladies infectieuses, sauf que plus nous avançons dans le temps, les vaccins apporteront potentiellement des contributions significatives au contrôle des maladies non infectieuses telles que les cancers, les maladies neurodégénératives et les maladies auto-immunes (Barrett 2016).

Les vaccins exploitent l'extraordinaire capacité du système immunitaire humain hautement évolué à réagir et à se souvenir des rencontres avec des antigènes pathogènes. (Pollard et Bijker 2021). Le développement des vaccins, qui préparent le système immunitaire à réagir à de futures infections, a entraîné une baisse mondiale de la morbidité et de la mortalité dues à de terribles maladies infectieuses transmissibles (Kennedy et al. 2020).

Les vaccins ont été développés en 2 grandes catégories : vivants atténués et tués inactivés, tous deux produisant des agents préventifs puissamment protecteurs (Plotkin 2022) pour distinguer les vaccins qui contiennent des souches répliquatives atténuées de l'organisme pathogène concerné de ceux qui ne contiennent que des composants d'un agent pathogène ou des organismes entiers tués. En plus des vaccins vivants et non vivants « traditionnels », plusieurs autres plateformes ont été développées au cours des dernières décennies (tableau 1.1), notamment des vecteurs viraux, des vaccins à base d'acide nucléique à base d'ARN et d'ADN, et des particules de type viral (Pollard et Bijker 2021).

Tableau 1.1. Les différents types de vaccin

Type de vaccin
Vaccin vivant atténuée
Vaccin inactive
Vaccin purifiée ne contient qu'un ou plusieurs fragments du microbe
Vaccin conjuguée
Vaccin par vecteur
Vaccin à ARN messager
Vaccin toxoïde
Vaccin à base de sous-unités (Sub-unit)

I.2. Histoire de la vaccination

I.2.1. La vaccination jennérienne

La science de la vaccinologie prend son envol le 14 mai 1796 quand Edward Jenner a inoculé James Phipps, un jeune garçon, avec le virus de la vaccine obtenu d'une jeune femme nommée Sarah Nelmes qui avait été accidentellement infectée par une vache nommée Rosebud. James Phipps a ensuite été retrouvé être « sécurisé » (immunisé) contre la variole, comme le démontre un défi infructueux avec le virus de la variole "quelques mois après". Peu de temps après, en 1798, Jenner prédit que l'utilisation systématique de son « vaccin », un terme proposé de nombreuses années plus tard par Louis Pasteur pour décrire l'invention de Jenner, serait entraîner « l'annihilation » de la variole. La prédiction de Jenner a finalement été réalisé le 9 décembre 1979 lorsque l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a certifié que l'un des pires fléaux de l'humanité avait été anéanti par un vaccin mis au point près de 200 ans auparavant (André 2003).

I.2.1.1. Mécanisme immunitaire de la vaccination jennérienne

Le principe qu'avait Jenner appliqué pour prévenir la variole est l'administration à un organisme pluricellulaire un germe pathogène de manière à lui faire acquérir un état de résistance spécifique. Ainsi, Jenner avait utilisé (sans en savoir le mécanisme) un germe peu pathogène mais douée d'une immunogénicité croisée avec la souche pathogène pour protéger contre la maladie provoquée par cette souche (figure1.1) (Krifi 2017).

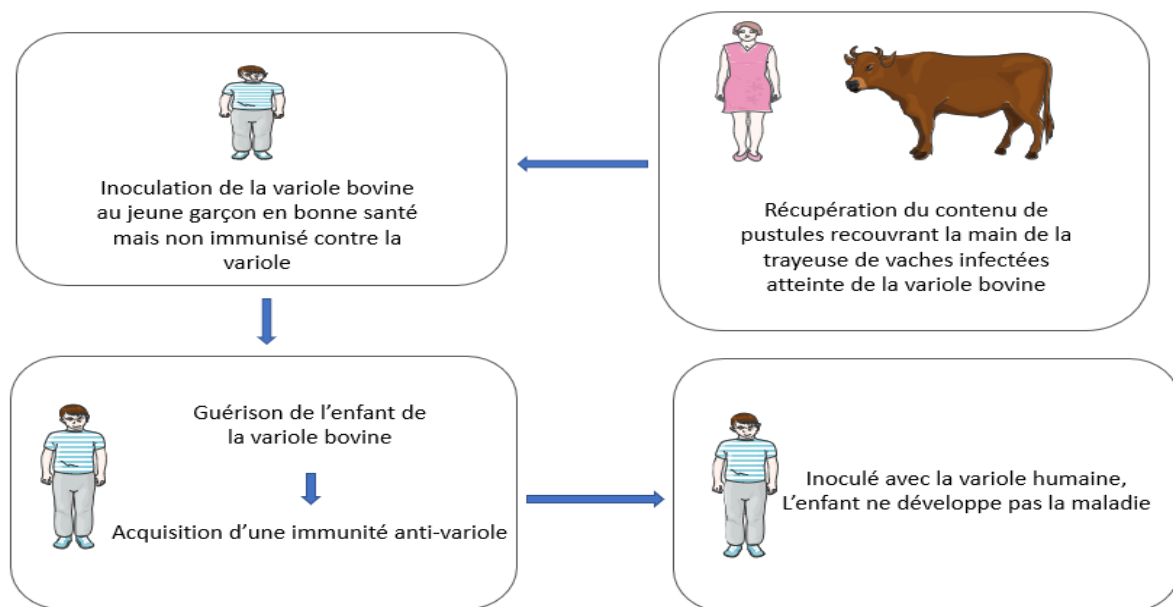


Figure 1.1. L'expérience d'EDWARD JENNER

I.2.2. Evolution du concept de la prévention des maladies infectieuses

La vaccination jennérienne antivariolique est connue pour son utilisation d'un germe peu pathogène (variole bovine) doté d'une immunité croisée avec le germe responsable d'une maladie grave (variole humaine) afin de protéger contre celle-ci. Lorsque Jenner avait réalisé la première vaccination réussie, il ignorait totalement son mécanisme d'action, l'origine microbienne des maladies infectieuses n'a été découverte qu'après plusieurs années plus tard par Louis Pasteur et Robert Koch (Krifi 2017).

I.2.2.1. Pasteur invente l'atténuation des vaccins

Pasteur qui avait découvert Staphylocoque et Streptocoque, partit de l'idée, a posteriori erronée, que le microbe de vaccin devait être une variété atténuée du microbe de la variole et que n'importe quel microbe pouvait être atténué et déclencher une immunisation contre l'agent virulent. Il mit au point sa méthode de l'atténuation pour des maladies animales. En 1878, l'agent du choléra des poules vieillit, il montra que les animaux inoculés avec ces bactéries dégénérées ne développent pas la maladie, mais aussi qu'ils ne sont plus infectés par une nouvelle inoculation de germes frais, c'est ainsi que le vaccin était né ! Il développa ensuite des vaccins contre le rouget du porc et le charbon du mouton (Sarlangue 2022).

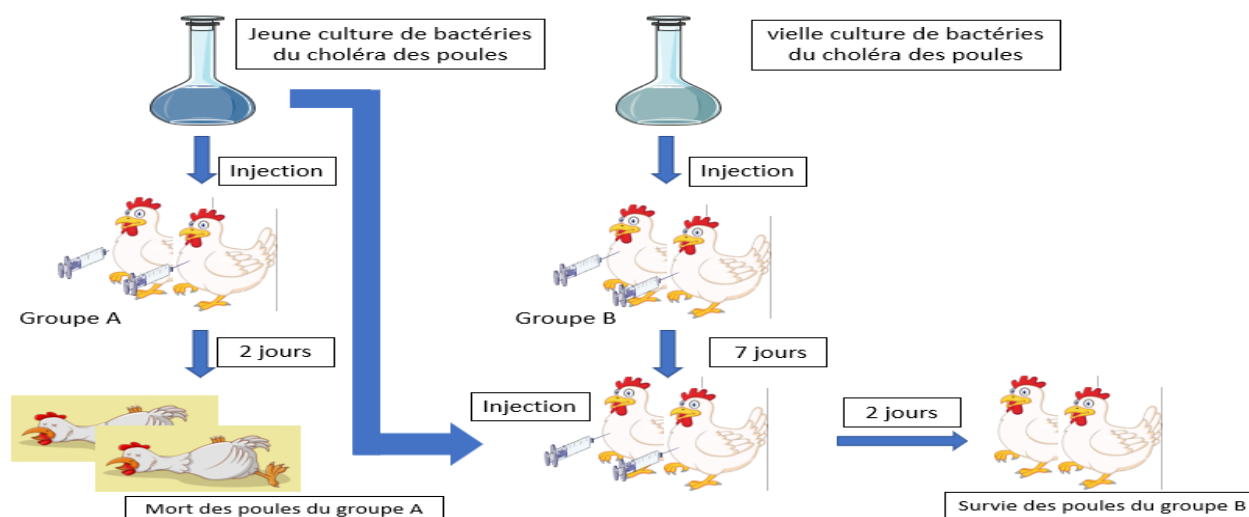


Figure 1.2. L'expérience de Pasteur

I.2.3. Immunité active et immunité passive

L'immunité active fait référence au processus d'exposition du corps à un antigène pour générer une réponse immunitaire adaptative : la réponse prend des jours/semaines à se développer mais peut être longue durable, voire à vie. L'immunité active est généralement classée comme naturelle ou acquise.

L'immunité passive : la protection contre l'infection peut être établie en administrant du plasma ou du sérum préformé contenant des anticorps d'un donneur ou d'un groupe de donneurs immuns qui avaient soit récupéré de l'infection, soit avaient été immunisés contre l'agent pathogène ou contre la toxine produite par l'agent pathogène (Pavia et Wormser 2021). Le transfert de l'anticorps antitétanique (principalement IgG) de la mère à travers le placenta fournit une immunité passive naturelle au nouveau-né pour plusieurs semaines/mois jusqu'à ce que cet anticorps soit dégradé et perdu. En revanche, l'immunité passive acquise fait référence au processus de l'obtention de sérum d'individus immunisés, ce qui mis cela en commun, concentrer la fraction d'immunoglobuline puis l'injecter pour protéger une personne sensible.

I.2.4. Vaccination versus sérothérapie

La sérothérapie est l'administration d'un sérum immunisant d'origine animale ou humaine pour protéger contre une maladie ou pour la traiter. La protection dans ce cas est immédiate, mais l'organisme receveur n'élabore lui-même aucun système de défense ; c'est une immunisation passive. La protection est limitée dans le temps (quelques semaines). Cependant, elle permet de juguler efficacement une infection contre laquelle le sujet n'aurait pas été préalablement vacciné.

Tableau 1.2. Comparaison entre la vaccination et la sérothérapie

Vaccination	Sérothérapie
Approche préventive	Approche curative
La faculté de faire acquérir à l'organisme des moyens de défense immunitaire spécifiques afin d'éviter la maladie	Fournir à l'organisme les moyens immunitaires de se défendre alors que l'infection est déjà déclarée.
Une immunité acquise de façon active	Une immunité acquise de façon passive
Durable dans le temps	Limitée dans le temps

I.3. Adjuvants

I.3.1. Définition

Le terme adjuvant vient du latin *adjuvare*, qui signifie aider ou secourir (Cox et Coulter 1997). Les adjuvants sont des agents immunostimulants qui peuvent améliorer et moduler les réponses aux antigènes et peuvent être utilisés comme outils pour améliorer la réactivité aux vaccins chez les populations vulnérables telles que les jeunes nourrissons (Aradottir Pind et al. 2022)

Ils peuvent être définis comme des substances qui augmentent l'immunogénicité d'une formulation de vaccin lorsqu'elles y sont ajoutées et/ou mélangées. (S et al. 2016)

I.3.2. Mécanisme d'action

Les vaccins ont pour but d'induire chez un hôte, sans lui nuire, les réactions immunes protectrices qu'il développe en générale en réponse à une attaque par un agent pathogène. Tout vaccin contient une partie antigénique spécifique de l'agent pathogène, cible fondamentale du vaccin, qui provoque une réponse des lymphocytes T (réponse cytotoxique) et B (anticorps) spécifique ainsi que la production de cellules mémoire. Ces réponses constituent la réponse d'immunité adaptative.

Cette réaction est provoquée par une stimulation concomitante des lymphocytes induite par ces trois signaux :

- Signal 0 : Ag (antigène) (avec le couple récepteur TCR/CMH ou BCR)
- Signal 1 : Costimulation (avec les couples CD80-86/CD28 ou CD40/CD40L ICAM /LFA ...)
- Signal 2 : Cytokines produites par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) dont l'expression est induite par les TLR (Toll-like receptors), CLR (C type-lectin receptors), entre autres l'inflammasome...

Donc, pour être efficace, le vaccin doit stimuler les mécanismes de l'immunité innée qui ont pour rôle d'activer les cellules qui produisent la réponse immune acquise adaptative : c'est le but des adjuvants.

Les adjuvants peuvent agir par une combinaison de divers mécanismes (figure1.3), notamment la formation d'un dépôt, l'induction de cytokines et de chimiokines, le recrutement de cellules immunitaires, l'amélioration de l'absorption et de la présentation de l'antigène et la promotion du transport de l'antigène vers les ganglions lymphatiques drainants. Il semble que

les adjuvants activent les réponses immunitaires innées pour créer un environnement immuno-compétent local au site d'injection.

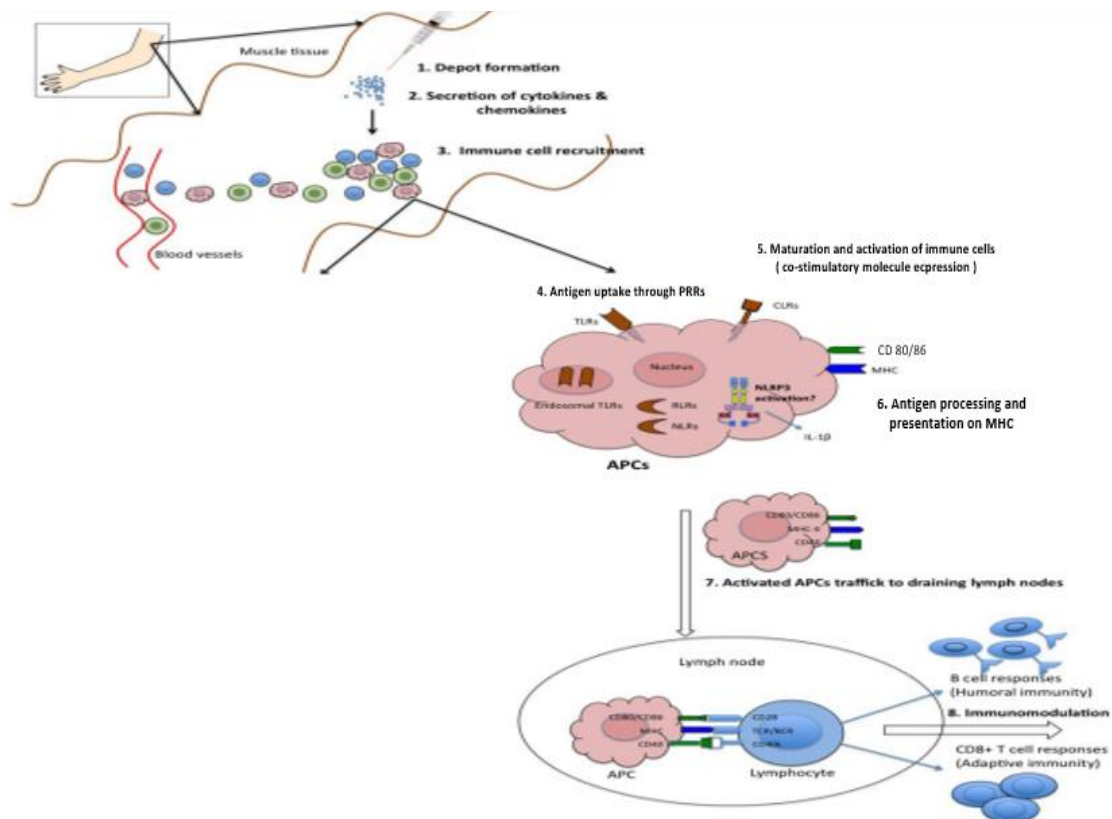


Figure 1.3. Mécanisme d'action de l'adjuvant (Awate, Babiuk, et Mutwiri 2013)

La découverte de la capacité du système immunitaire inné de reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes, les « PAMPs » (Pathogen-associated molecular patterns), par le biais de récepteurs spécialisés, les récepteurs TLR (Toll-like receptors) et NLR (NOD-like receptors), a eu des conséquences importantes pour le développement de nouveaux adjuvants. Le système immunitaire inné joue un rôle de sentinelle : les cellules qui le constituent (notamment les cellules dendritiques) sont activées au contact des PAMPs, ce qui déclenche leur maturation qui leur permet de présenter efficacement l'antigène aux lymphocytes T, dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité (système HLA) (Coffman, Sher, et Seder 2010). En même temps, elle déclenche l'émission de signaux d'alarme à base de cytokines et de chimiokines qui vont attirer davantage de lymphocytes T au point d'inflammation et pousser ceux-ci à se différencier en effecteurs polarisés. Cette découverte a tout naturellement poussé à l'utilisation des PAMPs comme adjuvants. Les adjuvants permettent donc d'augmenter le pouvoir immunogène du vaccin à travers la stimulation de la réponse innée (Marciani 2003).

Selon le type de réponses innées activées, les adjuvants peuvent altérer la qualité et la quantité des réponses immunitaires adaptatives (Awate, Babiuk, et Mutwiri 2013).

I.3.3. Les critères pour le choix d'un adjuvant

Les adjuvants ont été traditionnellement utilisés dans la formulation de vaccins pour tenter de :

Diminuer la quantité d'antigène, réduire le nombre de doses nécessaires pour induire une immunité protectrice, induire des réponses protectrices plus rapidement, et augmenter le taux de séroconversion dans des populations particulières (personnes âgées, personnes immunodéprimées, personnes atteintes de maladies chroniques, nouveau-nés et nourrissons) (figure 1.4) (Coffman, Sher, et Seder 2010).



Figure 1.4. Les critères pour le choix d'un adjuvant

Des études antérieures sur les adjuvants ont généralement examiné la production de cytokines à partir de cellules immunitaires activées par des adjuvants pour évaluer leur activité *in vitro* car l'effet des adjuvants est principalement médié par l'activation de cellules immunitaires innées telles que les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques et même des cellules non immunitaires, conduisant à l'induction de diverses cytokines, telles que les cytokines pro-inflammatoires (Hioki et al. 2022).

I.3.4. Les principaux adjuvants utilisés

Il existe actuellement une variété de composés aux propriétés adjuvantes, et ils semblent exercer leurs fonctions à travers différents mécanismes d'action. Les sels minéraux, les émulsions, les microparticules, les saponines, les cytokines, les composants/produits microbiens et les liposomes ont tous été évalués comme adjuvants.

Sels d'aluminium : Pour de nombreux vaccins administrés par voie sous-cutanée ou intramusculaire, un sel d'aluminium (soit l'hydroxyde soit le phosphate) est utilisé. L'ajout du sel d'aluminium facilite un dépôt fonctionnel, ou dépôt, au niveau du site d'injection qui entraîne la libération prolongée d'antigène sur une plus longue période de temps que la simple injection d'antigène dilué dans le tissu (Kozak et Hu 2023).

Autres adjuvants : Des découvertes récentes dans le récepteur de type péage humain (TLR) et la signalisation des chimiokines ont permis le développement de nouveaux vaccins adjuvants. Au cours de la dernière décennie, plusieurs nouveaux adjuvants ont été inclus dans les vaccins humains, à titre d'exemple, on peut citer AS01_B (dans le nouveau vaccin contre le zona), CpG (cytosine phospho-guanin) (dans le nouveau vaccin contre l'hépatite B) et MF59 (dans le vaccin contre la grippe) (figure 1.5). Ces systèmes adjuvants se distinguent le mieux par leurs formulations : émulsion, saponines et liposomales (Cr et al. 2012).

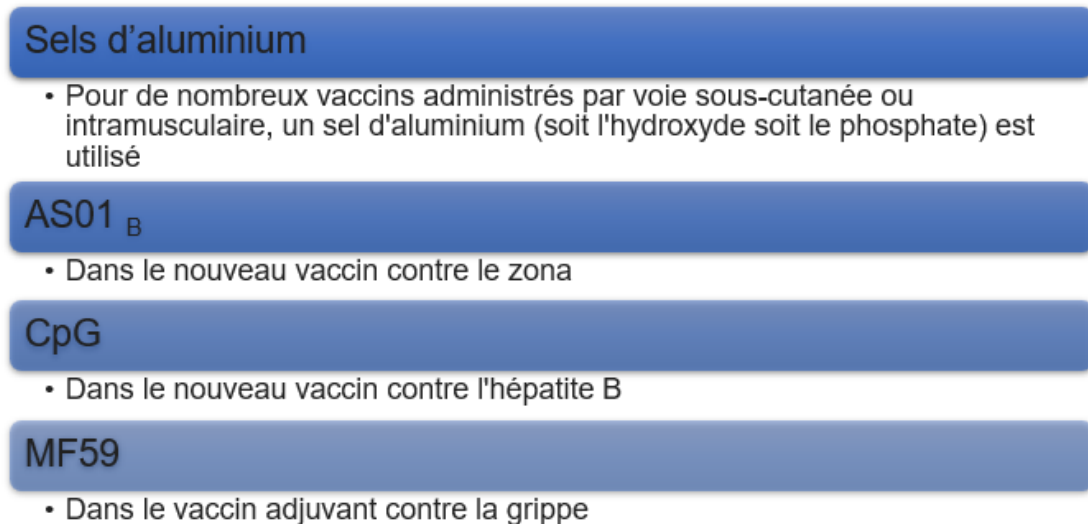


Figure 1.5. Les principaux adjuvants utilisés

I.4. Bacille Calmette Guérin (BCG)

I.4.1. Histoire

Le vaccin BCG a été découvert par Calmette et Guérin à l'institut Pasteur, France en 1921, sans pour autant avoir des connaissances sur son aperçu immunologique (Storgaard et al. 2015).

Il a été développé à partir d'une souche atténuée de *Mycobacterium bovis*, une sous-espèce apparentée de *M. Tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis*) (> 90% d'homologie) également appelée les bacilles de Koch (BK). Le BK est un germe pathogène obligatoire (c'est à dire qu'il n'existe pas de porteur sain), aérobic stricte dont la croissance est lente (deux à huit semaines) sur milieu solide de Loëwenstein. C'est un bacille pouvant être détruit par la chaleur et par l'alcool, mais qui résiste bien à la dessiccation, au froid, aux acides et aux bases (sa paroi est riche en acide mycolique) et qui peut rester virulent plusieurs jours dans les crachats.

L'immunisation clinique avec le BCG a commencé dès 1921 et son utilisation a été soutenue par les premiers essais menés par Heimbeck auprès des étudiants infirmiers en Norvège, où les étudiants vaccinés avec le BCG avaient des taux plus faibles de tuberculose active par rapport aux étudiants non vaccinés.

Aujourd'hui, la vaccination par le BCG est l'une des stratégies de vaccination les plus largement mises en œuvre dans le monde (Fatima et al. 2020).

I.4.2. Définition et fabrication

Le bacille de Calmette-Guérin (BCG) est la forme vaccinale vivante atténuée de *Mycobacterium bovis* utilisée pour prévenir la tuberculose et d'autres infections mycobactériennes. Le BCG est le vaccin le plus largement administré et il fait généralement partie du calendrier de vaccination systématique des nouveau-nés en Algérie. Le vaccin BCG offre également une protection contre les infections mycobactériennes non tuberculeuses telles que la lèpre et l'ulcère de Buruli. Il est également utilisé dans le traitement du carcinome superficiel de la vessie (Okafor, Rewane, et Momodu 2023).

Calmette et Guérin tournèrent leur attention vers une souche virulente de bacilles tuberculeux bovins précédemment isolés par Nocard chez une génisse. Par hasard, ils remarquèrent qu'en repiquant le bacille dans un milieu à base de glycérine, de pomme de terre et de bile de bœuf, la morphologie des colonies avait changé, et que le bacille avait perdu sa virulence. En 1908, ils commencèrent la culture d'une souche virulente sur un milieu à base de ces trois éléments en effectuant des repiquages toutes les trois semaines. Et c'est ainsi que 11 ans plus tard, après 230 repiquages, ils obtinrent une souche vivante atténuée ne provoquant pas de tuberculose aux différentes espèces animales (bœuf, cochons de Guinée, souris, singes rhésus, chimpanzés) chez qui ils l'administrèrent, mais qui au contraire, leur conférait une résistance après 30 jours, contre une ré-infestation par des bacilles tuberculeux bovins ou humains (Dannenberg Jr. et Rook 1994). Ils la prénommèrent « Bacille Bilié Calmette Guérin » qui perdit plus tard le terme « bilié » et devint Bacille de Calmette et Guérin (BCG).

I.4.3. BCG et adjuvant

Il existe un certain nombre de candidats adjuvants très prometteurs dans les tests cliniques qui ont des preuves solides de protection dans divers modèles animaux précliniques, y compris les primates non humains (PNH), et trois des candidats (IC31®, AS01, CAF01) ont démontré la capacité d'induire des réponses la réponse immunitaire à médiation cellulaire (CMI) dans les essais cliniques sur la tuberculose humaine (Agger 2016).

Tableau 1.3. Les adjuvants utilisés dans le vaccin BCG

Adjuvant	Antigène vaccinal	Livraison	Immunomodulateur	Voie de signalisation ^a
GLA-SE	ID93	Emulsion	GLA ; adjuvant lipide glucopyranosyle	TLR4
AS01	M72	Liposomes	MPL ; 3-O-désacyl-4'- monophosphoryl lipide A	TLR4
IC31®	H4/H56	Polypeptide	ODN1a ; oligodésoxynucléotide	TLR9
CAF01	H1	Liposomes	TDB ; une variante synthétique du facteur mycobactérien du cordon	Mincle ;

^a Voie de signalisation de l'immunomodulateur

I.4.4. Mode d'action

I.4.4.1. Effet du BCG

La réponse immunitaire déclenchée après la vaccination par le BCG commence au site d'inoculation après l'injection intradermique, où les neutrophiles résidants, les macrophages et les cellules dendritiques (DC) interagissent avec le bacille. La reconnaissance du BCG par les cellules immunitaires se fait par l'interaction de différents récepteurs de reconnaissance de formes (PRR) avec des modèles moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP), tels que le peptidoglycane, l'arabinogalactane et les acides mycoliques situés au niveau de la paroi cellulaire de la bactérie (Dockrell et Smith 2017).

Après internalisation par les DC, la mycobactérie peut vivre jusqu'à 2 semaines à l'intérieur de ces cellules (Jiao et al. 2002). Cette interaction induit la maturation et la migration des DC qui se caractérisent par une augmentation de l'expression de molécules co-stimulatrices, telles que CD40, CD80, CD83 et CD86. L'un des antigènes présents dans la paroi cellulaire du BCG correspond à l'antigène (Ag) 85 (également présent chez *M. tuberculosis*), qui stimule la production du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), de l'interleukine 1-bêta (IL-1 β) et IL-6, capables de générer un état proinflammatoire favorisant l'activation des cellules immunitaires (Covián et al. 2019).

Le développement d'une réponse immunitaire adaptative commence lorsque les cellules présentatrices d'antigène (APC, par exemple, DC, macrophages et cellules B) présentent des peptides antigéniques sur les molécules du CMH et les cellules T primaires situées au niveau des tissus lymphoïdes secondaires les plus proches ou de la rate (Kaufmann 2013). Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les CD cutanées infectées par le BCG migrent vers les ganglions lymphatiques drainants où elles sécrètent du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-12 et activent à la fois les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (figure 1.6) (Covián et al. 2019).

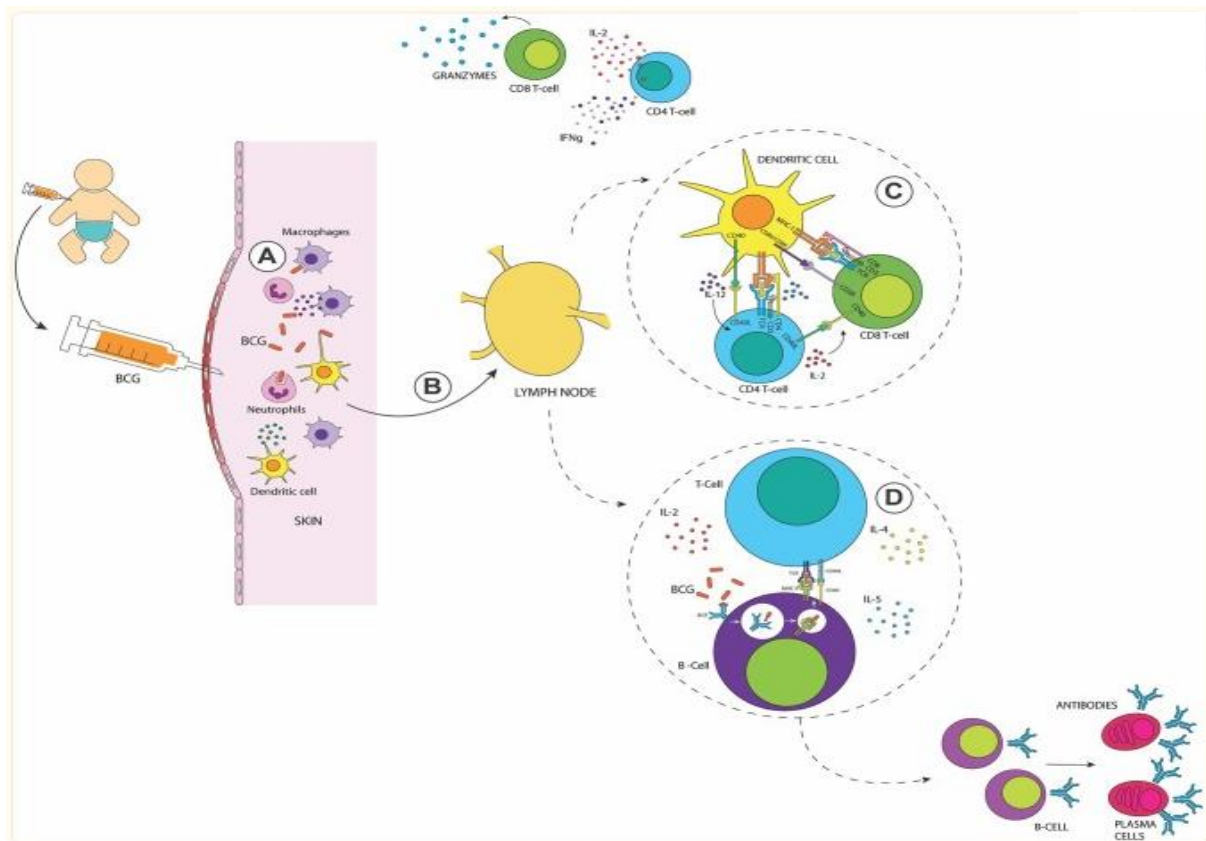


Figure 1.6. Mode d'action du vaccin BCG (Covián et al. 2019)

La réponse immunitaire partiellement protectrice amorcée par la vaccination par le BCG atténue la gravité de la maladie, et empêche l'accumulation progressive de leucocytes générateurs de radicaux libres

La capacité antioxydante totale du sérum était significativement appauvrie après 15 jours de l'infection par *Mtb*. La vaccination par le BCG avant la provocation par aérosol a maintenu la capacité antioxydante du sérum chez les sujets infectés par *M. tuberculosis* (Palanisamy et al. 2011).

I.4.5. Limites d'utilisation du BCG

Plusieurs hypothèses ont émergé pour expliquer l'échec de la vaccination BCG. Il s'agit notamment des conditions climatiques, de la latitude géographique, du fond génétique de l'hôte et de la souche de BCG utilisée. La préexposition aux mycobactéries environnementales, qui sont assez courantes dans régions tropicales conduit à compromettre la protection offerte par la vaccination par le BCG (Fatima et al. 2020).

L'exposition de l'hôte aux mycobactéries environnementales fournit un certain niveau d'immunité protectrice contre la tuberculose et l'immunisation ultérieure des personnes pré-exposées avec BCG n'améliore pas davantage le niveau de protection (Fine 1995).

La réplication du BCG est inhibée en présence d'une sensibilisation préalable avec l'environnement mycobactéries, en raison de la présence d'une réponse immunitaire préexistante aux antigènes communs aux mycobactéries. La réplication du BCG est une condition préalable à l'obtention d'une réponse de mémoire immunitaire puisqu'il s'agit d'un vivant vaccin (Fatima et al. 2020).

Des études antérieures ont montré que le BCG ne peut être que modestement protecteur, voire totalement inefficace contre la tuberculose dans les populations humaines (Andersen et Doherty 2005). Le dernier rapport de l'OMS sur la tuberculose dans le monde reste choquant, avec environ 9,9 millions de personnes infectées et plus de 1,43 million de décès dus à la maladie en 2020. La mortalité due à la tuberculose a été plus gravement touchée par la pandémie de COVID-19 en 2020 (Qu, Zhou, et Li 2021). La tuberculose est actuellement la principale cause de mortalité infectieuse dans le monde, ce qui nécessite le développement de stratégies de vaccination efficaces (Kuan et al. 2020).

I.4.6. Le potentiel redox

Les systèmes cellulaires d'oxydo-réduction (redox) sont des réseaux largement définis qui se composent de producteurs d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), d'enzymes antioxydantes et d'effecteurs redox ainsi que de ROS et de plusieurs petites molécules redox (NADPH, glutathion, etc.) (Tretter et al. 2021). Typiquement, l'oxygène moléculaire (O_2) peut réagir avec le superoxyde générateur d'électrons qui peut être rapidement converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par les superoxyde dismutases (SOD). H_2O_2 , la molécule non radicalaire la plus importante, peut être convertie en eau par des catalases et autres enzymes (Vallières et al. 2023).

I.4.6.1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est un phénomène causé par un déséquilibre entre la production et l'accumulation des ROS telle que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans les cellules et les tissus et la capacité d'un système biologique à détoxifier ces produits réactifs.; ils sont générés en tant que sous-produits métaboliques par les systèmes biologiques qui doivent être maintenues à un niveau bas (Rajendran et al. 2014). Lorsque la production de ROS augmente, ils commencent à montrer des effets nocifs sur des structures cellulaires importantes comme les protéines, les lipides et les acides nucléiques. Les radicaux libres sont générés à partir de sources endogènes et exogènes. L'activation des cellules immunitaires, l'inflammation, l'ischémie, l'infection, le cancer, l'exercice excessif, le stress mental et le vieillissement sont tous responsables de la production endogène de radicaux libres (Pizzino et al. 2017)

- **Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)**

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), une espèce d'oxygène réactif non radicalaire générée au cours de nombreuses conditions (patho)physiologiques, est actuellement universellement reconnu comme un médiateur important des processus régulés par redox. Selon son profil d'accumulation spatio-temporel, cette molécule peut agir comme messenger de signalisation ou provoquer des dommages oxydatifs (Lismont, Revenco, et Fransen 2019).

I.4.6.2. Les antioxydants

Le corps humain a mis en place plusieurs stratégies pour contrer les effets des radicaux libres et du stress oxydatif, basées sur des antioxydants enzymatiques (par exemple catalase) et non enzymatiques endogène telle que l'Albumine ou exogène telle que les vitamines (vitamine C, vitamine E).

a) Les antioxydants enzymatiques

- **La catalase**

Une catalase est l'une des enzymes antioxydantes les plus importantes qui atténue considérablement le stress oxydatif. Elle est présente dans presque tous les organismes

aérobies. La catalase décompose deux molécules de peroxyde d'hydrogène en une molécule d'oxygène et deux molécules d'eau dans une réaction (Nandi et al. 2019).

b) Les antioxydants non enzymatiques

• L'Albumine

L'albumine sérique est la protéine circulante la plus abondante chez les mammifères, y compris l'homme (Tabata et al. 2021). Elle constitue des défenses antioxydantes extracellulaires dans le plasma sanguin très puissante. La protéine possède des propriétés antioxydantes telles que la liaison étroite du cuivre et faiblement du fer, piégeant les radicaux libres, par exemple l'acide hypochloreux (HOCl) et le peroxyde d'azote (ONOOH) (Sitar, Aydin, et Cakatay 2013).

I.5. Bromélaïne

I.5.1. Définition

La bromélaïne est une enzyme protéolytique majeure trouvée dans les plantes d'ananas, ayant de multiples activités dans de nombreux domaines. En raison de sa faible toxicité, de son haut rendement, de sa grande disponibilité et de sa relative simplicité d'acquisition, elle fait l'objet d'un intérêt remarquable pour les scientifiques (Hikisz et Bernasinska-Slomczewska 2021). Vicente Marcano, un scientifique vénézuélien, a découvert la bromélaïne pour la toute première fois en 1891, et son extraction et ses recherches ont commencé en 1894. La bromélaïne est abondante à la fois dans le fruit et la tige des ananas, Heinecke révélant en 1957 que la tige d'ananas contenait beaucoup plus de bromélaïne que le fruit réel, permettant la monétisation d'un sous-produit de déchet qui est la bromélaïne de tige (Agrawal et al. 2022).

I.5.2. Caractéristiques biochimiques

La bromélaïne est un composé non toxique à valeur thérapeutique, classé comme protéase enzymatique digérant les protéines. Il convient de noter que l'extrait de bromélaïne, en plus de diverses thiol endopeptidases, comprend également d'autres composants tels que les phosphatases, la glucosidase, les cellulases, les peroxydases, les glycoprotéines, les glucides, plusieurs inhibiteurs de protéase et le calcium (Ca^{2+}) lié organiquement. (Hikisz et Bernasinska-Slomczewska 2021).

La bromélaïne de la tige a une structure secondaire stable. Entre pH 7 et 10, il est actif, mais il perd son action de manière irréversible au-dessus de pH 10. À un pH de 14, la bromélaïne de tige forme une configuration typique de masse gélatineuse chauffée. Enfin, il a été démontré que la bromélaïne reste stable pendant longtemps lorsqu'elle est conservée à des températures inférieures à 20 °C (Agrawal et al. 2022).

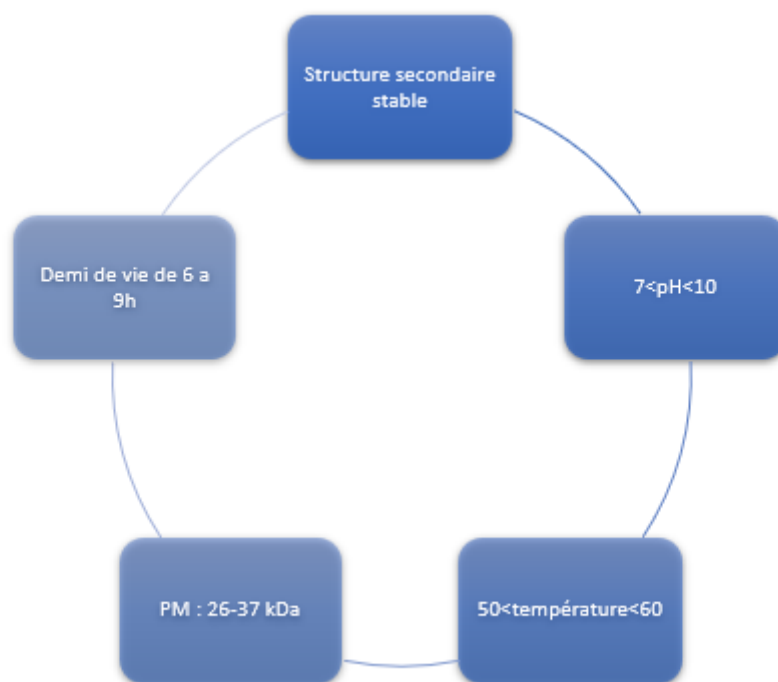


Figure 1.7. Les caractéristiques biochimiques de la bromélaïne

I.5.3. Application clinique

I.5.3.1. Effet Immunomodulateur de la bromélaïne

De nombreuses études indiquent que la bromélaïne possède des propriétés immunomodulatrices très complexes réalisées à de nombreux niveaux des voies de signalisation moléculaire et de contrôle de l'expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire. La bromélaïne a un double effet sur la modulation de la réponse immunologique, ce qui est important pour le bon fonctionnement du système immunitaire et la préservation de l'homéostasie (Agrawal et al. 2022).

En fonction du microenvironnement de la cellule, de la présence de conditions inflammatoires et enfin de l'état de santé général, la bromélaïne peut entraîner à la fois une augmentation et une diminution de l'activité et de l'expression des mêmes molécules impliquées dans la réponse immunitaire (Hikisz et Bernasinska-Slomczewska 2021).

La bromélaïne active les médiateurs inflammatoires, notamment l'interleukine (IL)-1 β , l'IL-6, l'interféron (INF)- γ et le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α dans les macrophages de souris et les cellules mononucléaires du sang périphérique humain (PBMC) (Engwerda et al. 2001). Ces résultats ont indiqué que la bromélaïne active potentiellement le système immunitaire sain en association avec la réponse rapide au stress cellulaire. Inversement, la bromélaïne réduit la sécrétion d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF- α lorsque les cellules immunitaires sont déjà stimulées dans l'état de surproduction induite par l'inflammation de cytokines. La bromélaïne active les cellules tueuses naturelles (NK) et augmente la production de facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages, IL-2, IL-6 et diminue l'activation des cellules T auxiliaires. Ainsi, elle diminue la majorité des médiateurs inflammatoires et a démontré un rôle important en tant qu'agent anti-inflammatoire dans diverses conditions (Rathnavelu et al. 2016).

I.5.4. Les avantages de la bromélaïne

La bromélaïne est efficace dans la gestion du cancer, des plaies graves, de l'inflammation, de l'arthrose, de la plaque dentaire, de la gingivite et de différentes infections, elle est considérée comme une enzyme de grande valeur dans le secteur thérapeutique. La bromélaïne peut être utilisée comme alternative à de nombreux composants chimiques et médicaments synthétiques, car il s'agit d'une substance naturelle et inoffensive, elle est facilement récupérable et en quantité importante. La bromélaïne intervient indirectement pour bloquer spécifiquement la formation des prostaglandines pro-inflammatoires ce qui lui donne un effet immunomodulateur important (Agrawal et al. 2022).

À ce jour, il a été prouvé que la bromélaïne est bien absorbée par l'organisme après administration orale et qu'elle n'a pas d'effets secondaires importants, même après des périodes prolongées (Hikisz et Bernasinska-Slomczewska 2021).

I.6. Problématique et test d'hypothèse

Le BCG est le seul vaccin utilisé pour prévenir la maladie de la tuberculose. Il a contribué à réduire la mortalité infantile due à la tuberculose en protégeant contre la tuberculose extrapulmonaire via la stimulation des réponses immunitaires. Cependant, l'incidence actuelle de la tuberculose démontre que le BCG ne protège pas suffisamment contre la tuberculose pulmonaire, l'efficacité protectrice du BCG est en moyenne de 50 % mais varie considérablement selon la situation géographique et il est plus faible chez les personnes ayant déjà été exposées aux mycobactéries. Le BCG peut également provoquer des effets indésirables chez les personnes immunodéprimées. De ce fait, il est de grand intérêt d'améliorer l'efficacité du BCG en boostant sa réactivité à l'aide des immunomodulateurs.

La bromélaïne est un extrait brut de l'ananas qui contient, entre autres composants, diverses protéinases étroitement apparentées, démontrant, *in vitro* et *in vivo* des activités immunostimulatrices, anticœdémateuses, anti-inflammatoires et autres. En raison de son efficacité après administration, de sa sécurité et de l'absence d'effets secondaires indésirables, un large éventail d'avantages thérapeutiques a été revendiqué. La bromélaïne agit comme un immunomodulateur en augmentant la stimulation des cellules immunitaires, l'activité immunomodulatrice de la bromélaïne a des implications importantes pour son utilisation comme adjuvants de vaccins, ce qui nous a fait penser à son utilisation comme adjuvant avec le BCG afin d'augmenter son efficacité.

Objectifs

Evaluer l'effet *ex vivo* de bromélaïne sur les niveaux des marqueurs de l'activité protectrice des cellules (Catalase, Albumine) sur les PBMCs traitées ou non par BCG.

Evaluer l'effet *ex vivo* de bromélaïne sur les niveaux de la production de H₂O₂ par les PBMCs traitées ou non par BCG.

But

Montrer l'effet *ex vivo* de la bromélaïne sur le potentiel redox des cellules mononucléées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs), traités par le BCG.

II. Matériel et Méthodes

CONFIDENTIEL

III. Interprétation des résultats

CONFIDENTIEL

IV. Discussion :

CONFIDENTIEL

V. Conclusions et perspectives

Les vaccins antituberculeux devraient avoir la capacité à moduler modérément les signaux régulateurs complexes induits par Mtb, de créer un équilibre sensible entre l'inflammation et les réponses immunitaires régulatrices, et de maintenir de fortes réponses immunitaires mémoire pendant une longue période. La stratégie de vaccination par le BCG doit être continuellement améliorée pour assurer l'efficacité de la stratégie de contrôle de Mtb dans le monde. Nous constatons récemment l'insuffisance de BCG à la protection de la maladie de la tuberculose, de ce fait, divers vaccins sont développés pour booster l'effet immunitaire du BCG. De plus, la bromélaïne est connue par son effet immunomodulateur qui permet de réguler la réponse immunitaire face aux infections, et autres affections. Les vaccins antituberculeux devraient avoir la capacité de moduler modérément les signaux régulateurs complexes induits par Mtb, de créer un équilibre délicat entre l'inflammation et les réponses immunitaires régulatrices.

Donc notre nouvelle approche était d'étudier l'effet adjuvant de la bromélaïne sur l'activité protectrice redox des PBMCs traitées par le BCG et nous avons constaté que la bromélaïne confère une excellente protection cellulaire, tout en augmentant significativement l'activité catalase et celle de l'Albumine endocytaire.

Étant donné que le BCG est considéré comme moins efficace pour la prévention de l'infection que pour la prévention de la maladie, et avec le développement rapide de la science et des technologies, nous pensons que le développement de stratégies de vaccination par le BCG sera une direction de recherche cruciale et importante et exercera ses rôles positifs dans la santé publique. Comme proposé partiellement la bromélaïne présente une piste meilleure d'adjuvant pour une proposition d'une nouvelle préparation vaccinale plus efficace. La stratégie de vaccination par le BCG doit être continuellement améliorée pour assurer l'efficacité de la stratégie de contrôle de Mtb dans le monde tout en assurant une régulation du potentiel redox pour cela nous proposons d' :

Évaluer le taux de d'autres marqueurs antioxydants comme l'enzyme superoxyde dismutase, glutathione peroxydase et le taux de la vitamine C.

Évaluer le taux d'expression de l'ARN messager de l'enzyme de la catalase et d'autres enzymes antioxydante pour affirmer les résultats d'analyses par RT-PCR quantitative.

Essayer d'autres techniques, telles que, l'immunofluorescence pour voir la capacité à effectuer l'endocytose de l'albumine ou peut-être d'autres marqueurs de protection cellulaire marqués avec un fluorochrome.

Références

A

- Agger, Else Marie. 2016. « Novel adjuvant formulations for delivery of anti-tuberculosis vaccine candidates ». *Advanced drug delivery reviews* 102 (juillet): 73-82. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.012>.
- Agrawal, Paridhi, Pradnya Nikhade, Aditya Patel, Nikhil Mankar, et Shweta Sedani. 2022. « Bromelain: A Potent Phytomedicine ». *Cureus*, août. <https://doi.org/10.7759/cureus.27876>.
- Amaral, Eduardo P., Caian L. Vinhaes, Deivide Oliveira-de-Souza, Betania Nogueira, Kevan M. Akrami, et Bruno B. Andrade. 2021. « The Interplay Between Systemic Inflammation, Oxidative Stress, and Tissue Remodeling in Tuberculosis ». *Antioxidants & Redox Signaling* 34 (6): 471-85. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8124>.
- Andersen, Peter, et T. Mark Doherty. 2005. « The Success and Failure of BCG - Implications for a Novel Tuberculosis Vaccine ». *Nature Reviews. Microbiology* 3 (8): 656-62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1211>.
- André, Francis E. 2003. « Vaccinology: Past Achievements, Present Roadblocks and Future Promises ». *Vaccine* 21 (7-8): 593-95. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00702-8](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00702-8).
- Aradottir Pind, Audur Anna, Sigrun Thorsdottir, Gudbjorg Julia Magnusdottir, Andreas Meinke, Giuseppe Del Giudice, Ingileif Jonsdottir, et Stefania P. Bjarnarson. 2022. « A Comparative Study of Adjuvants Effects on Neonatal Plasma Cell Survival Niche in Bone Marrow and Persistence of Humoral Immune Responses ». *Frontiers in Immunology* 13: 904415. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.904415>.
- Awate, Sunita, Lorne A. Babiuk, et George Mutwiri. 2013. « Mechanisms of Action of Adjuvants ». *Frontiers in Immunology* 4: 114. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00114>.

B

- Barrett, Alan D T. 2016. « Vaccinology in the twenty-first century ». *NPJ Vaccines* 1 (juillet): 16009. <https://doi.org/10.1038/npjvaccines.2016.9>.
- Bhat, Shabir Ahmad, Nisha Singh, Abhishek Trivedi, Pallavi Kansal, Pawan Gupta, et Ashwani Kumar. 2012. « The Mechanism of Redox Sensing in Mycobacterium Tuberculosis ». *Free Radical Biology & Medicine* 53 (8): 1625-41. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.008>.

C

- Chandwani, Neelam D., Neetu Maurya, Pradnya Nikhade, et Jaya Chandwani. 2022. « Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of calcium hydroxide, triple antibiotic paste and bromelain against *Enterococcus faecalis*: An In Vitro study ». *Journal of Conservative Dentistry : JCD* 25 (1): 63-67. https://doi.org/10.4103/jcd.jcd_461_21.
- Coffman, Robert L., Alan Sher, et Robert A. Seder. 2010. « Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work ». *Immunity* 33 (4): 492-503. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>.
- Covián, Camila, Ayleen Fernández-Fierro, Angello Retamal-Díaz, Fabián E. Díaz, Abel E. Vasquez, Margarita K. Lay, Claudia A. Riedel, Pablo A. González, Susan M. Bueno, et Alexis M. Kalergis. 2019. « BCG-Induced Cross-Protection and Development of Trained Immunity: Implication for Vaccine Design ». *Frontiers in Immunology* 10 (novembre): 2806. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02806>.
- Cox, J. C., et A. R. Coulter. 1997. « Adjuvants--a Classification and Review of Their Modes of Action ». *Vaccine* 15 (3): 248-56. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(96\)00183-1](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(96)00183-1).
- Cr, Alving, Peachman Kk, Rao M, et Reed Sg. 2012. « Adjuvants for human vaccines ». *Current opinion in immunology* 24 (3). <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.03.008>.

D

- Dahou, Sara, Mohammed Chems-Eddine Smahi, Wafa Nouari, Zoheir Dahmani, Souheila Benmansour, Lamia Ysmail-Dahlouk, Maroua Miliani, et al. 2021. « L-Threoascorbic Acid Treatment Promotes S. Aureus-Infected Primary Human Endothelial Cells Survival and Function, as Well as Intracellular Bacterial Killing, and Immunomodulates the Release of IL-1 β and Soluble ICAM-1 ». *International Immunopharmacology* 95 (juin): 107476. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107476>.
- Dannenbergh Jr., Arthur M., et Graham A. W. Rook. 1994. « Pathogenesis of Pulmonary Tuberculosis: An Interplay of Tissue-Damaging and Macrophage-Activating Immune Responses—Dual Mechanisms That Control Bacillary Multiplication ». In *Tuberculosis*, 459-83. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1128/9781555818357.ch27>.
- Denis, M, A Forget, M Pelletier, et E Skamene. 1988. « Pleiotropic effects of the Bcg gene: III. Respiratory burst in Bcg-congenic macrophages. » *Clinical and Experimental Immunology* 73 (3): 370-75.
- Di Simplicio, Paolo, Simona Frosali, Raffaella Priora, Domenico Summa, Francesca Cherubini Di Simplicio, Danila Di Giuseppe, et Anna Di Stefano. 2005. « Biochemical and Biological Aspects of Protein Thiolation in Cells and Plasma ». *Antioxidants & Redox Signaling* 7 (7-8): 951-63. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.951>.
- Dockrell, Hazel M., et Steven G. Smith. 2017. « What Have We Learnt about BCG Vaccination in the Last 20 Years? » *Frontiers in Immunology* 8 (septembre): 1134. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01134>.

E

- Engwerda, C. R., D. Andrew, A. Ladhams, et T. L. Mynott. 2001. « Bromelain Modulates T Cell and B Cell Immune Responses in Vitro and in Vivo ». *Cellular Immunology* 210 (1): 66-75. <https://doi.org/10.1006/cimm.2001.1807>.

F

- Fatima, Samreen, Anjna Kumari, Gobardhan Das, et Ved Prakash Dwivedi. 2020. « Tuberculosis Vaccine: A Journey from BCG to Present ». *Life Sciences* 252 (juillet): 117594. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117594>.
- Fine, P. E. M. 1995. « Variation in Protection by BCG: Implications of and for Heterologous Immunity ». *The Lancet* 346 (8986): 1339-45. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)92348-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)92348-9).
- Francis, Geoffrey L. 2010. « Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications ». *Cytotechnology* 62 (1): 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10616-010-9263-3>.

G

- Gagneux-Brunon, Amandine, et Elisabeth Botelho-Nevers. 2022. « Que reste-t-il du BCG 100 ans après ? » *Médecine et Maladies Infectieuses Formation* 1 (3): 116-21. <https://doi.org/10.1016/j.mmifmc.2022.04.001>.

H

- Hale, Laura P., Paula K. Greer, et Gregory D. Sempowski. 2002. « Bromelain Treatment Alters Leukocyte Expression of Cell Surface Molecules Involved in Cellular Adhesion and Activation ». *Clinical Immunology* 104 (2): 183-90. <https://doi.org/10.1006/clim.2002.5254>.
- Hikisz, Pawel, et Joanna Bernasinska-Slomczewska. 2021. « Beneficial Properties of Bromelain ». *Nutrients* 13 (12): 4313. <https://doi.org/10.3390/nu13124313>.
- Hioki, Kou, Tomoya Hayashi, Yayoi Natsume-Kitatani, Kouji Kobiyama, Burcu Temizoz, Hideo Negishi, Hitomi Kawakami, et al. 2022. « Machine Learning-Assisted Screening of

Herbal Medicine Extracts as Vaccine Adjuvants ». *Frontiers in Immunology* 13 (mai): 847616. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.847616>.

J

Jiao, Xinan, Richard Lo-Man, Pierre Guermonprez, Laurence Fiette, Edith Dériaud, Sophie Burgaud, Brigitte Gicquel, Nathalie Winter, et Claude Leclerc. 2002. « Dendritic Cells Are Host Cells for Mycobacteria in Vivo That Trigger Innate and Acquired Immunity ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (3): 1294-1301. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.3.1294>.

K

Kandasamy, Rama, Merryn Voysey, Fiona McQuaid, Karlijn de Nie, Rebecca Ryan, Olivia Orr, Ulrike Uhlig, Charles Sande, Daniel O'Connor, et Andrew J Pollard. 2016. « Non-specific immunological effects of selected routine childhood immunisations: systematic review ». *The BMJ* 355 (octobre): i5225. <https://doi.org/10.1136/bmj.i5225>.

Kashyap, Rajpal S., Aliabbas A. Husain, Shweta H. Morey, Milind S. Panchbhai, Poonam S. Deshpande, Hemant J. Purohit, Girdhar M. Taori, et Hatim F. Daginawala. 2010. « Assessment of Immune Response to Repeat Stimulation with BCG Vaccine Using in Vitro PBMC Model ». *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines* 8 (mai): 3. <https://doi.org/10.1186/1476-8518-8-3>.

Kaufmann, Stefan H. E. 2013. « Tuberculosis Vaccines: Time to Think about the next Generation ». *Seminars in Immunology* 25 (2): 172-81. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.04.006>.

Kennedy, Richard B., Inna G. Ovsyannikova, Peter Palese, et Gregory A. Poland. 2020. « Current Challenges in Vaccinology ». *Frontiers in Immunology* 11 (juin): 1181. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01181>.

Kozak, Michael, et Jiafen Hu. 2023. « The Integrated Consideration of Vaccine Platforms, Adjuvants, and Delivery Routes for Successful Vaccine Development ». *Vaccines* 11 (3). <https://doi.org/10.3390/vaccines11030695>.

Krifi, Mohamed Naceur. 2017. *Naissance et essor de la vaccinologie et de l'immunothérapie*. ISTE Group.

Kuan, R., K. Muskat, B. Peters, et C. S. Lindestam Arlehamn. 2020. « Is Mapping the BCG Vaccine-Induced Immune Responses the Key to Improving the Efficacy against Tuberculosis? ». *Journal of Internal Medicine* 288 (6): 651-60. <https://doi.org/10.1111/joim.13191>.

Kwiatkowska, S., G. Piasecka, M. Zieba, W. Piotrowski, et D. Nowak. 1999. « Increased Serum Concentrations of Conjugated Diens and Malondialdehyde in Patients with Pulmonary Tuberculosis ». *Respiratory Medicine* 93 (4): 272-76. [https://doi.org/10.1016/s0954-6111\(99\)90024-0](https://doi.org/10.1016/s0954-6111(99)90024-0).

L

Lamsal, Madhab, Narayan Gautam, Narendra Bhatta, Bishamber Dass Toora, Shymal Kumar Bhattacharya, et Nirmal Baral. 2007. « Evaluation of Lipid Peroxidation Product, Nitrite and Antioxidant Levels in Newly Diagnosed and Two Months Follow-up Patients with Pulmonary Tuberculosis ». *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 38 (4): 695-703.

Lismont, Celien, Iulia Revenco, et Marc Fransen. 2019. « Peroxisomal Hydrogen Peroxide Metabolism and Signaling in Health and Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (15): 3673. <https://doi.org/10.3390/ijms20153673>.

M

Marciani, Dante J. 2003. « Vaccine Adjuvants: Role and Mechanisms of Action in Vaccine Immunogenicity ». *Drug Discovery Today* 8 (20): 934-43. [https://doi.org/10.1016/s1359-6446\(03\)02864-2](https://doi.org/10.1016/s1359-6446(03)02864-2).

Menshchikova, Elena, Nikolay Zenkov, Victor Tkachev, Oksana Potapova, Liliya Cherdantseva, et Vyacheslav Shkurupiy. 2013. « Oxidative Stress and Free-Radical

Oxidation in BCG Granulomatosis Development ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013: 452546. <https://doi.org/10.1155/2013/452546>.

Miggiano, Riccardo, Menico Rizzi, et Davide M. Ferraris. 2020. « Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis, Infection Prevention and Treatment ». *Pathogens* 9 (5): 385. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050385>.

Murphy, Emily C., et Adam J. Friedman. 2019. « Hydrogen Peroxide and Cutaneous Biology: Translational Applications, Benefits, and Risks ». *Journal of the American Academy of Dermatology* 81 (6): 1379-86. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2019.05.030>.

N

Nandi, Ankita, Liang-Jun Yan, Chandan Kumar Jana, et Nilanjana Das. 2019. « Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019 (novembre): 9613090. <https://doi.org/10.1155/2019/9613090>.

Ne, Nieuwenhuizen, et Kaufmann She. 2018. « Next-Generation Vaccines Based on Bacille Calmette-Guérin ». *Frontiers in immunology* 9 (mai). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00121>.

O

Okafor, Chika N., Ayesan Rewane, et Ifeanyi I. Momodu. 2023. « Bacillus Calmette Guerin ». In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538185/>.

Ossowski, I. von, G. Hausner, et P. C. Loewen. 1993. « Molecular Evolutionary Analysis Based on the Amino Acid Sequence of Catalase ». *Journal of Molecular Evolution* 37 (1): 71-76. <https://doi.org/10.1007/BF00170464>.

P

Pai, Madhukar, Marcel A. Behr, David Dowdy, Keertan Dheda, Maziar Divangahi, Catharina C. Boehme, Ann Ginsberg, et al. 2016. « Tuberculosis ». *Nature Reviews. Disease Primers* 2 (octobre): 16076. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>.

Palanisamy, Gopinath S., Natalie M. Kirk, David F. Ackart, Crystal A. Shanley, Ian M. Orme, et Randall J. Basaraba. 2011. « Evidence for Oxidative Stress and Defective Antioxidant Response in Guinea Pigs with Tuberculosis ». *PLoS ONE* 6 (10): e26254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026254>.

Pavia, Charles S., et Gary P. Wormser. 2021. « Passive immunization and its rebirth in the era of the COVID-19 pandemic ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 57 (3): 106275. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106275>.

Pizzino, Gabriele, Natasha Irrera, Mariapaola Cucinotta, Giovanni Pallio, Federica Mannino, Vincenzo Arcoraci, Francesco Squadrito, Domenica Altavilla, et Alessandra Bitto. 2017. « Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017: 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>.

Plotkin, Stanley A. 2022. « Why We Need Precision Vaccinology ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 75 (Suppl 1): S2-4. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac434>.

Pollard, Andrew J., et Else M. Bijker. 2021. « A guide to vaccinology: from basic principles to new developments ». *Nature Reviews. Immunology* 21 (2): 83-100. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>.

Q

Qu, Mengjin, Xiangmei Zhou, et Hao Li. 2021. « BCG Vaccination Strategies against Tuberculosis: Updates and Perspectives ». *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 17 (12): 5284-95. <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.2007711>.

R

Rajendran, Peramaiyan, Natarajan Nandakumar, Thamaraiselvan Rengarajan, Rajendran Palaniswami, Edwinoliver Nesamony Gnanadhas, Uppalapati Lakshminarasiah, Jacob Gopas, et Ikuo Nishigaki. 2014. « Antioxidants and Human Diseases ». *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 436 (septembre): 332-47. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>.

Rathnavelu, Vidhya, Noorjahan Banu Alitheen, Subramaniam Sohila, Samikannu Kanagesan, et Rajendran Ramesh. 2016. « Potential role of bromelain in clinical and therapeutic applications ». *Biomedical Reports* 5 (3): 283-88. <https://doi.org/10.3892/br.2016.720>.

S

S, Apostólico Jde, Lunardelli Va, Coirada Fc, Boscardin Sb, et Rosa Ds. 2016. « Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing ». *Journal of immunology research* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1459394>.

Sarlangue, J. 2022. « Histoire des vaccinations, de la variole à la Covid-19 ». *Perfectionnement en Pédiatrie* 5 (1): 72-83. <https://doi.org/10.1016/j.perped.2022.01.012>.

Shangari, Nandita, et Peter J. O'Brien. 2006. « Catalase Activity Assays ». *Current Protocols in Toxicology* 27 (1). <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0707s27>.

Sitar, Mustafa Erinç, Seval Aydin, et Ufuk Cakatay. 2013. « Human Serum Albumin and Its Relation with Oxidative Stress ». *Clinical Laboratory* 59 (9-10): 945-52.

Storgaard, Line, Amabelia Rodrigues, Cesario Martins, Bibi Uhre Nielsen, Henrik Ravn, Christine Stabell Benn, Peter Aaby, et Ane Bærent Fisker. 2015. « Development of BCG Scar and Subsequent Morbidity and Mortality in Rural Guinea-Bissau ». *Clinical Infectious Diseases* 61 (6): 950-59. <https://doi.org/10.1093/cid/civ452>.

T

Tabata, Fuka, Yasuaki Wada, Satomi Kawakami, et Kazuhiro Miyaji. 2021. « Serum Albumin Redox States: More Than Oxidative Stress Biomarker ». *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10 (4): 503. <https://doi.org/10.3390/antiox10040503>.

Tretter, Verena, Beatrix Hochreiter, Marie Louise Zach, Katharina Krenn, et Klaus Ulrich Klein. 2021. « Understanding Cellular Redox Homeostasis: A Challenge for Precision Medicine ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (1): 106. <https://doi.org/10.3390/ijms23010106>.

V

Vallières, Cindy, Marie-Pierre Golinelli-Cohen, Olivier Guittet, Michel Lepoivre, Meng-Er Huang, et Laurence Vernis. 2023. « Redox-Based Strategies against Infections by Eukaryotic Pathogens ». *Genes* 14 (4): 778. <https://doi.org/10.3390/genes14040778>.

Vincent, Jean-Louis, James A Russell, Matthias Jacob, Greg Martin, Bertrand Guidet, Jan Wernerman, Ricard Ferrer Roca, Stuart A McCluskey, et Luciano Gattinoni. 2014. « Albumin administration in the acutely ill: what is new and where next? » *Critical Care* 18 (4): 231. <https://doi.org/10.1186/cc13991>.