

TLEMCCEN N° D'ORDRE



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCCEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie



Mémoire

Présenté pour obtenir le grade

DE MASTER II EN IMMUNOLOGIE

Par

Rahma BOUTAYEB

Soutenu le

25 juin 2023

Intitulé

L'effet adjuvant de la bromélaïne sur la signalisation cellulaire et les voies métaboliques des cellules mononuclées du sang périphérique traitée par le bacille de Calmette-Guérin (BCG).

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

Les jurys:

Président	Dr. Ismet SMAHI	Professeur	UAB- Tlemcen
Encadrant	Dr. Mourad ARIBI	Professeur	UAB- Tlemcen
Examinatrice	Dr. Wafa NOUARI	Maître de conférences B	UAB- Tlemcen
Examinatrice	Dr. Maroua MILIANI	Maître de conférences B	UAB- Tlemcen

25 Juin 2023

Avant-Propos

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie, sous la direction de Pr. Mourad ARIBI qui m'a ouvert les portes de son laboratoire. Je vous adresse mes plus sincères remerciements. Que se travail soit le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Mme Rabia MESSALI, Sara DAHOU, Soumeya BENAMARA, Souad ZOUDJI, et Houria BENARRADJ, avec leurs précieux conseils, leur dévouement, leur disponibilité et bien sur leur patience, merci de m'avoir guidé tout au long de ce projet, les mots ne me suffisent pas pour exprimer ma gratitude envers vous et à quel point j'ai apprécié vous aides.

Mes sincères remerciements à mes camarades et avec qui j'ai partagé tous mes travaux kawther, lamis et zineb je vous apprécié pour votre précieuse aide.

Je remercie tous les membres du jury pour leur honorable présence.

- ❖ Professeur Mourad ARIBI directeur du laboratoire BIOMOLIM. UABT
- ❖ Professeur Ismat SMAHI. UABT
- ❖ Mme Wafa NOUARI Maître de conférences B. UABT
- ❖ Mme Maroua MILIANI Maître de conférences B. UABT

Je dédie ce travail à mes très chers parents qui m'ont soutenu tout au long de mes études sans eux je ne serai jamais arrivé ou j'en suis.

Mes sœurs Amara, Assia et Fatiha et mes frères Sid Ahmed, Mohammed et Djalal et ma nièce Nadia qui m'ont encouragé et aidé moralement.

Noureddine qui m'a supporté dans les moments les plus difficiles.

Table des matières

Abstract	v
ملخص	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAU	viii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	ix
Problématique et Objective	16
CHAPITRE 1. Revue de la littérature	2
1.1. Vaccinologie	3
1.2 Histoire de la vaccination	4
1.2.1. Vaccination Jenner	4
1.2.2. Vaccination pasteur	4
1.2.2.1. Les vaccins vivants atténués	4
1.3.1 Immunité active et immunité passive	5
1.4. Vaccinations vs sérothérapie	6
1.4.1. Vaccination.....	6
1.4.2. La sérothérapie.....	6
1.5.1. Qu'est-ce qu'un adjuvant ?	7
1.5.2. Mécanisme d'action des adjuvants.....	7
1.5.3. Intérêt et le choix	8
1.5.3.1 intérêts de l'utilisation des adjuvants.....	8
1.5.3.2. L'adjuvant idéal.....	8
1.6. Le bacille de Calmette-Guèrin BCG	9
1.6.1 Histoire.....	9
1.6.3. BCG et adjuvants.....	10
1.6.4. Mode d'action.....	10
1.6.5. L'efficacité de BCG.....	11
1.6.6. Les inconvénients de la BCG	12
1.7. Bromélaïne.....	13
1.7.1. Définition de bromélaïne.....	13
1.7.2. Caractéristique biochimique.....	13
1.7.3. Les applications cliniques.....	13
1.7.4. Avantages.....	13
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	2
1. Conception de l'étude	Erreur ! Signet non défini.
2.1. Isolement et culture des PBMCs	Erreur ! Signet non défini.

2.4. Déterminant des taux de Glucose (GLU)	Erreur ! Signet non défini.
2.5. Déterminant des taux de Cholestérol	Erreur ! Signet non défini.
2.6. Déterminant des taux de Calcium (Ca ²⁺)	Erreur ! Signet non défini.
2.7. Test statistique	Erreur ! Signet non défini.
Chapitre 3 : Résultats et interprétation	2
3.1. Effet de la bromélaïne couplée à la BCG sur les niveaux du cholestérol CHOL dans les PBMCs	Erreur ! Signet non défini.
3.3. Effet de la bromélaïne combiné avec BCG sur les niveaux de Glucose intracellulaires dans les PBMCs	Erreur ! Signet non défini.
Chapitre 4. Discussion	Erreur ! Signet non défini.
4.1. Effet de la bromélaïne en présence de BCG sur les niveaux de calcium Ca ²⁺ dans les PBMCs	Erreur ! Signet non défini.
4.2. Effet de la bromélaïne et du BCG combinés ou non sur les taux du cholestérol dans les PBMCs	Erreur ! Signet non défini.
4.3. Effet de la bromélaïne et BCG combinés ou non sur l'absorption du glucose intracellulaire par les PBMCs activé par du LPS.	Erreur ! Signet non défini.
Chapitre 5. Conclusions et perspectives	25
Chapitre 6. Bibliographie et Références	26

Résumé

Introduction : Le bacille de Calmette-Guérin (BCG) est le seul vaccin homologué contre la tuberculose (TB). Cependant, le BCG a une efficacité variable et ne peut pas complètement prévenir l'infection et la transmission de la tuberculose. Par conséquent, la prévalence mondiale de la tuberculose nécessite le développement urgent d'un vaccin antituberculeux plus efficace. La bromélaïne est une enzyme naturelle présente dans l'ananas. Elle est souvent utilisée comme adjuvant dans certains traitements médicaux. Dans cette optique, nous avons évalué l'effet adjuvant de la bromélaïne combiné au BCG.

Objectif : Nous avons évalué l'effet de la bromélaïne et du BCG combinés ou non sur présence intracellulaires de calcium, glucose et cholestérol précisément dans les lysats cellulaires.

But : Nous avons essayé de montrer que la bromélaïne pourrait avoir un effet adjuvant combiné avec le BCG sur les cellules mononucléaire du sang

Conclusion: la bromélaïne, est une molécule immunomodulatrice par excellence, répond parfaitement au critère d'adjuvantité, ce qui la qualifie d'excellent adjuvant.

Mots clés : BCG, Bromélaïne, calcium, glucose, cholestérol, voie métabolique, adjuvant, PBMCs

Abstract

Introduction: Bacille Calmette-Guérin (BCG) is the only licensed vaccine against tuberculosis (TB). However, BCG has variable efficacy and cannot completely prevent infection and transmission of tuberculosis. Therefore, the global prevalence of tuberculosis necessitates the urgent development of a more effective tuberculosis vaccine. Bromelain is a natural enzyme found in pineapple. It is often used as an adjuvant in certain medical treatments. With this in mind, we evaluated the adjuvant effect of bromelain combined with BCG.

Objective: We evaluated the effect of bromelain and BCG combined or not on the intracellular presence of calcium, glucose and cholesterol precisely in cell lysates.

Aim: We tried to show that bromelain could have a combined adjuvant effect with BCG on blood mononuclear cells.

Conclusion: Bromelain, an immunomodulatory molecule par excellence, perfectly meets the criterion of adjuvanticity, which qualifies it as an excellent adjuvant.

Key words: BCG, Bromelain, calcium, glucose, cholesterol, metabolic pathway, adjuvant, PBMCs

ملخص

المقدمة: Bacille Calmette-Guérin (BCG) هو اللقاح الوحيد المرخص له ضد السل (TB) ومع ذلك، فإن لقاح عصية كالميت (BCG) فعالية متغيرة ولا يمكنها منع العدوى وانتقال السل بشكل كامل. لذلك، فإن الانتشار العالمي لمرض السل يستلزم التطوير العاجل لقاح أكثر فعالية ضد السل. البرومييلين هو إنزيم طبيعي موجود في الأناناس. غالبًا ما يستخدم كمساعد في بعض العلاجات الطبية. مع وضع هذا في الاعتبار، قمنا بتقييم التأثير المساعد للبرومييلين مع BCG.

الهدف: قمنا بتقييم تأثير البرومييلين و BCG معًا أو لا على التواجد داخل الخلايا للكالسيوم والجلوكوز والكوليسترول على وجه التحديد في محلات الخلية.

الغاية: حاولنا إظهار أن البرومييلين يمكن أن يكون له تأثير مساعد مشترك مع BCG على خلايا الدم أحادية النواة.

الخلاصة: البرومييلين، جزيء مناعي بامتياز، يلبي تمامًا معيار المساعدة، مما يؤهله كمساعد ممتاز.

الكلمات المفتاحية: BCG، البرومييلين، الكالسيوم، الجلوكوز، الكوليسترول، المسار الأيضي، المواد المساعدة، PBMCs

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Expérience d'Edward Jenner, (Esparza et al. 2017).....	4
Figure 1.2. Expérience de Louis Pasteur, (Smith, 2012).....	5
Figure 1.3. Schéma de la vaccination vs Sérothérapie (Espinosa & Chillet, 2006).	6
Figure 1.4. Schéma représente les 3 signaux activés par l'adjuvant.....	7
Figure 1.5. Signaux ciblé par adjuvants (Facciola et al, 2022)	8
Figure 1.6. Les réponses immunitaires innées, adaptatives générées par le vaccin de BCG, (Ahmed et al., 2021).....	11
Figure 1.7. Principales voies métaboliques des cellules immunitaires, (Ganeshan & Chawla, 2014).....	14
Figure 1.8. Signalisation calcique, (Bootman, 2012)	15
Figure 2.1. Schéma récapitulatif de la partie matériel et méthode	Erreur ! Signet non défini.
Isolement des PBMCs (peripheral blood mononuclear cells).....	17
Figure 2.3. 10 Distribution des groupes dans la plaque de 24 puits.....	Erreur !
Signet non défini.	
Figure 3.1. Figure 11 Effet de la bromélaïne et du BCG combinés ou non sur l'absorption du cholestérol intracellulaire par les PBMCs.....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 3.2. Le taux de la production de calcium intracellulaire.....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 3.3. Effet de la bromélaïne et BCG combinés ou non sur l'absorption du glucose intracellulaire par les PBMCs.....	Erreur ! Signet non défini.

LISTE DES TABLEAU

Tableau 1.1. Exemples de vaccins, (Baxter, 2007).....	2
--	----------

LISTE DES ABREVIATIONS

APC: cellules présentatrices d'antigène

ATP: molécules d'adénosine triphosphate

BCG: Bacillus Calmette-Guérin

Brom: La bromélaïne

IL-6: Interleukine 6

LDH: lactate déshydrogénase

M.bovis: Mycobacterium bovis

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

PAMPs .. : Pathogen Associated Molecular
Patterns

PRRs: Pattern Recognition Receptor

SBM: La bromélaïne de tige

Tb: la tuberculose

TGF- β : Transforming Growth Factor Beta

TLR: Tol Like Receptor

TNF- α : Facteur de Nécrose Tumorale

LPS: lipopolysaccharides

iGlu: glucose intracellulaire

bCa²⁺: calcium liée

NegCo: contrôle négative

tccCHO: la

CaM: Ca²⁺/calmoduline

GLUT : Transporteurs de glucose Na⁺
indépendants

BIOMOLIM : Laboratoire de biologie
moléculaire appliquée et d'immunologie

ATP: Adénosine triphosphate

EDTA : Acide éthylène dinitrilotétra
acétique

ROS: Reactive Oxygen Species

PBS: Phosphate-Buffered Salin

tccCHOL : teneur cellulaire totale en
cholestérol

Introduction

Introduction

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) est l'agent responsable de la tuberculose (Tb), l'une des maladies infectieuses avec la morbidité et la mortalité les plus élevées au monde. Elle affecte principalement les poumons. La tuberculose se transmet généralement par l'inhalation de gouttelettes aéroportées contenant la bactérie, émises par une personne infectée lorsqu'elle tousse, éternue ou parle (Rahlwes et al., 2023; Swaminathan et al., 2021).

Pour cette raison, la vaccination par le BCG est née, qui est une souche atténuée de *Mycobacterium bovis* (*M.bovis*), et il tire son nom des scientifiques Albert Calmette et Camille Guérin, et demeure le seul vaccin agréé contre la tuberculose pour une utilisation clinique dès 1921. Le BCG est administré par voie intradermique et est largement utilisé dans plusieurs pays, en particulier chez les nourrissons (Qu et al., 2021), dans le but de limiter le risque de développer l'infection et de prévenir les formes graves de la Tb chez les jeunes enfants, mais son efficacité varie de 75% à 85%. De ce fait, le vaccin Bacillus Calmette-Guérin (BCG) a fait l'objet de plusieurs études visant à améliorer son efficacité à l'aide des adjuvants qui augmente nettement l'immunogénicité d'un vaccin (Gupta & Siber, 1995).

D'ailleurs, la bromélaïne est qualifiée de bon adjuvant vue ses caractéristiques d'adjuvantité. La bromélaïne est une enzyme protéolytique chimio sensible naturelle efficace dérivée des tiges d'ananas (Muhammad & Ahmad, 2017), elle est utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle pour ses propriétés thérapeutiques et digestives, Il a été signalé comme ayant des effets positifs sur le système respiratoire, digestif et circulatoire, et potentiellement sur le système immunitaire, et il a été notée qu'elle a un effet immunomodulateur notamment la sécrétion des cytokines et les molécules de signalisation dans diverses études, car elle peut à la fois activer et supprimer le système immunitaire (Chakraborty et al., 2021), et aussi elle peut réguler la réponse immunitaire, et influencer les cellules du système immunitaires telles que les lymphocytes.

Dans notre étude nous avons pensé à tester l'effet adjuvant de la bromélaïne sur la signalisation cellulaire et les voies métaboliques des cellules mononuclées du sang périphérique traitées par le BCG.

CHAPITRE 1. Revue de la littérature

Revue de la littérature

1.1. Vaccinologie

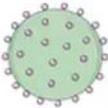
L'utilisation du terme « vaccinologie » est devenue de plus en plus importante au cours de la dernière décennie (Tuells, 2012). Il est défini comme la science des vaccins et comprend historiquement la recherche fondamentale, les immunogènes, les réponses immunitaires de l'hôte, les stratégies et techniques vaccinales, l'administration, la fabrication et l'évaluation clinique (André, 2003).

Bien que la vaccinologie soit traditionnellement se concentrée sur les maladies infectieuses, au début du XXI^e siècle, les vaccins pourraient également apporter une contribution significative à la lutte contre les maladies non transmissibles telles que le cancer et les maladies neurodégénératives.

Le principe de la vaccination est d'induire une protection contre les agents pathogènes en imitant l'interaction naturelle des agents pathogènes avec le système immunitaire humain. Les vaccins réduisent le risque de complications et de décès dus à l'exposition à des agents infectieux (Pulendran, 2014).

De plus, il existe différents types de vaccins (Baxter, 2007), (Tableau 1.1).

Tableau 1.1. Exemples de vaccins, (Baxter, 2007)

Plateforme		Exemple de vaccins homologués
Vaccin inactivé		<ul style="list-style-type: none"> • Vaccin contre la grippe • Vaccin contre la poliomyélite • Vaccin contre la rage
Vaccin sous-unitaire		<ul style="list-style-type: none"> • Vaccin contre l'hépatite B • Vaccin contre le zona
Vaccin à particule pseudo-virales		<ul style="list-style-type: none"> • Vaccin contre les virus du papillome humain (<i>Gardasil^{MD}</i>)
Vaccin à vecteur virale		<ul style="list-style-type: none"> • Vaccin contre le virus Ebola
Vaccin à ADN ou à ARN		
Vaccin atténuée		<ul style="list-style-type: none"> • vaccin contre la tuberculose BCG

Revue de la littérature

1.2 Histoire de la vaccination

1.2.1. Vaccination Jenner

En 1796, après une épidémie de cowpox près de Berkeley, le terme «cowpox» est utilisé depuis plus d'un siècle et demi pour désigner le vaccin (Huygelen 1996b), Edward Jenner examine sa jeune servante, Sarah Nelmes. Elle a développé des pustules après avoir reçu une petite égratignure alors qu'elle s'occupait d'une vache. Il reconnaît qu'elle est porteuse de vaccin. James Phipps, huit ans, qui n'a pas encore échappé à la variole (Figure 1.1), reçoit une injection dans son bras avec du matériel prélevé sur les pustules d'une cow-girl James Phipps a développé des symptômes légers de variole bovine, mais il s'est rapidement rétabli. Après quelques mois, Jenner a inoculé à James du matériel provenant de pustules de variole humaines retrouvé être immunisé contre la variole, «la protection est complète» (Esparza et al. 2017), (André 2003).

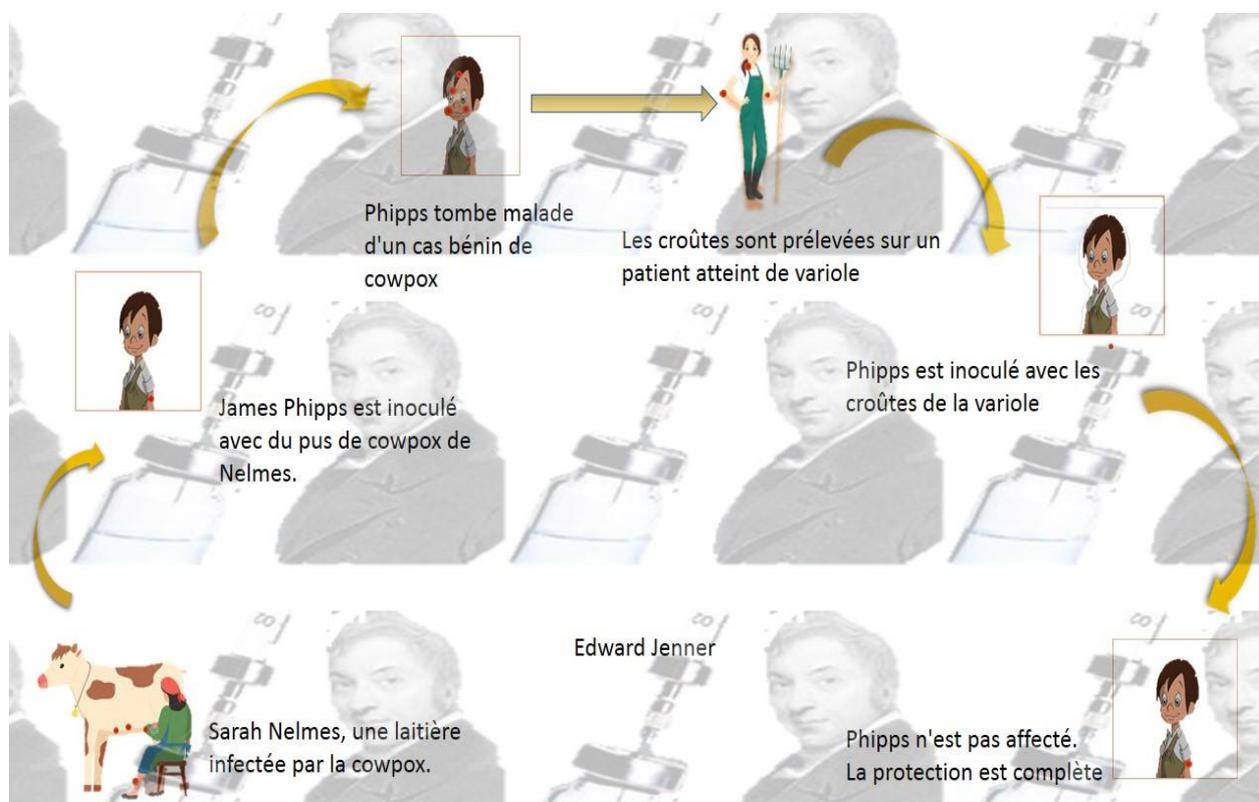


Figure 1.1. Expérience d'Edward Jenner, (Esparza et al. 2017)

1.2.2. Vaccination pasteur

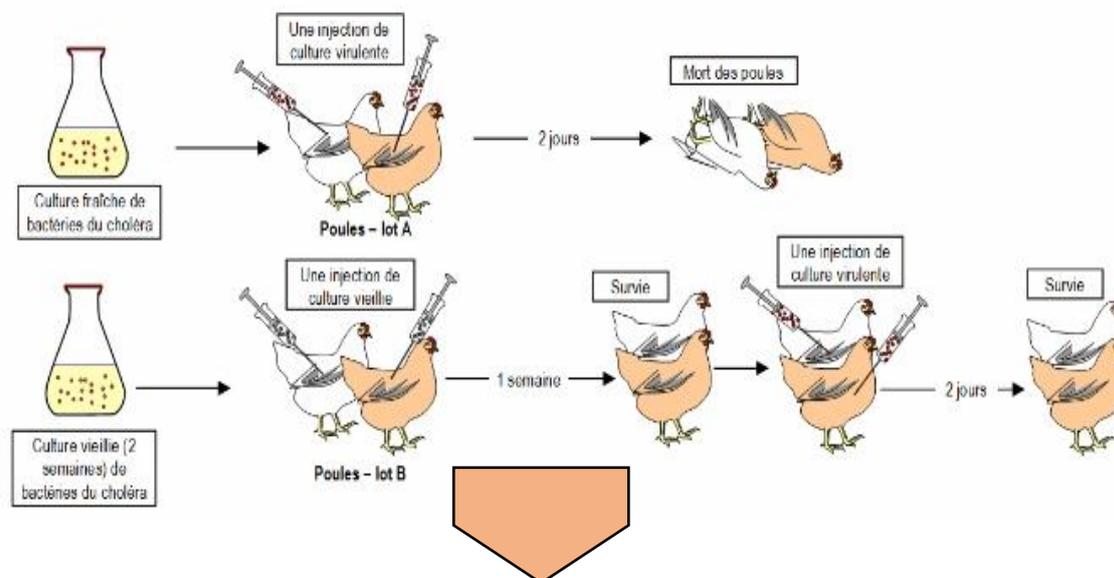
1.2.2.1. Les vaccins vivants atténués

En 1879, Louis Pasteur a développé le premier vaccin vivant atténué artificiel. Il s'agit du vaccin contre le choléra des poules (Figure1.2). Il est constitué de la même souche provoquant la maladie mais avec moins de virulence.

En 1881, il a développé selon le même principe la vaccination contre le charbon des moutons. Il a réalisé une épreuve publique dans la même année en introduisant un vaccin

Revue de la littérature

aux 25 moutons puis en leurs inoculant des cultures virulentes deux semaines après. Sur 50 moutons, les 25 moutons vaccinés résistent et tous les 25 moutons non vaccinés meurent (Smith, 2012).



En 1879, Pasteur injecta des bactéries provenant de culture fraîche et observa que les poules meurent à chaque fois. Un jour, il utilisa une "vieille" culture abandonnée depuis quelques semaines dans un laboratoire. Il injecta des bactéries provenant de cette vieille culture et constata que les poules ne meurent pas.

Figure 12 Expérience de Louis Pasteur, (Smith, 2012)

1.3. Rappel immunologique

1.3.1 Immunité active et immunité passive

L'immunisation permet de procurer au corps humain les moyens de se défendre contre une agression biologique avant qu'elle survienne.

1.3.1.1. Immunité active

Chaque individu produit ces propres anticorps ; caractérisée par une action décalée dans le temps et la durée d'action prolongée.

Il existe deux types comme suivant

- Naturelle: Anticorps produits en réponse à une infection
- Artificielle: Anticorps produits en réponse à un vaccin (Vivant, tué ou une anatoxine) (Baxter, 2007).

1.3.1.2. Immunité passive

La prévention contre l'infection est générée par l'administration du sérum contenant des anticorps à partir d'un donneur immunisé ou de groupes de donneurs guéris d'une infection, ou ont été immunisés contre l'agent pathogène et ces toxines (Pavia & Wormser, 2021).

Revue de la littérature

Un prototype naturel dans ce cas est rétabli lors d'une grossesse ou la transmission des anticorps (principalement IgG) de la mère travers le placenta génère une immunité passive au bébé durant des semaines ou des mois jusqu'à ce que les anticorps soient dégradés et perdus (Marcotte & Hammarström, 2015).

1.4. Vaccinations vs sérothérapie

1.4.1. Vaccination

La vaccination est une moyenne simple, sûr et efficace pour protéger la communauté des maladies dangereuses, avant d'être en contact avec ces affections. Elle utilise les défenses naturelles de l'organisme pour créer une résistance à des infections spécifiques et renforcer le système immunitaire (Justiz Vaillant & Grella, 2023).

Les vaccins stimulent le système immunitaire pour créer des anticorps, de la même manière que s'il était exposé à la maladie. Mais les formes des vaccins tuées ou atténuées des germes ne provoquent pas la maladie et n'exposent pas le sujet à des risques de complications.

La plupart des vaccins sont administrés par injection, mais certains se prennent par voie orale ou par aérosol nasal (Chaudhari, 2021).

1.4.2. La sérothérapie

La sérothérapie sert à injecter un sérum immunisant d'origine animale ou humaine dans le but de protéger l'organisme contre une maladie ou la traiter. Cette protection ne dure que quelque semaine, c'est-à-dire le temps nécessaire pour le catabolisme des anticorps transmis, et aucune mémoire immunologique n'est générée.

Ce traitement thérapeutique est une immunisation passive qui peut être utilisée pour but prophylactique afin de prévenir certaines affections chez des sujets à risques (immunodéprimés principalement) ou dans des situations d'urgence (Espinosa & Chillet, 2006).



Figure 1.3. Schéma de la vaccination vs Sérothérapie (Espinosa & Chillet, 2006).

1.5. Adjuvant

1.5.1. Qu'est-ce qu'un adjuvant ?

Le terme « adjuvant » vient du latin adjuvare signifiant aider, assister. Les adjuvants peuvent être des molécules, des composés ou des complexes macromoléculaires qui améliorent la puissance, la qualité ou la longévité de réponses immunitaires particulière à un antigène, nécessaire qu'ils soient peu toxiques.

En général ces molécules peuvent être classées comme agents immun modulateurs qui ciblent les cellules présentatrices d'antigène (APC), qui sont au cœur de l'immunité innée et adaptative (Alving et *al.*, 2012).

La puissance d'un vaccin dépend non seulement des composants antigéniques, mais aussi des adjuvants qui sont souvent utilisés pour stimuler le système immunitaire de manière plus efficace (Facciola et *al.*, 2022).

1.5.2. Mécanisme d'action des adjuvants

Un antigène est spécifiquement associé à un adjuvant qui agit comme son support en agissant après injection à l'activation du système immunitaire inné qui peut induire des réponses pro-inflammatoires locales, conduisant au recrutement de cellules immunitaires. Plus précisément, les complexes antigène-adjuvant activent les voies de signalisation du récepteur de reconnaissance de formes Pattern Recognition Receptor (PRRs) en agissant comme des modèles moléculaires associés aux agents pathogènes ; Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs). Il en résulte la production des cytokines, chimiokines et l'activation des cellules immunitaire (Facciola et *al.*, 2022)(Figure1.4).

La façon dont les adjuvants agissent est caractérisée par ces trois signaux suivants

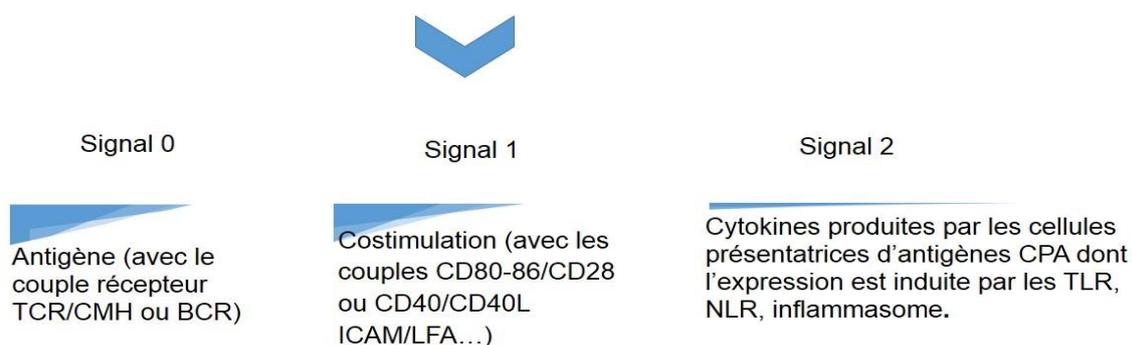


Figure 1.4. Schéma représente les 3 signaux activés par l'adjuvant

Revue de la littérature

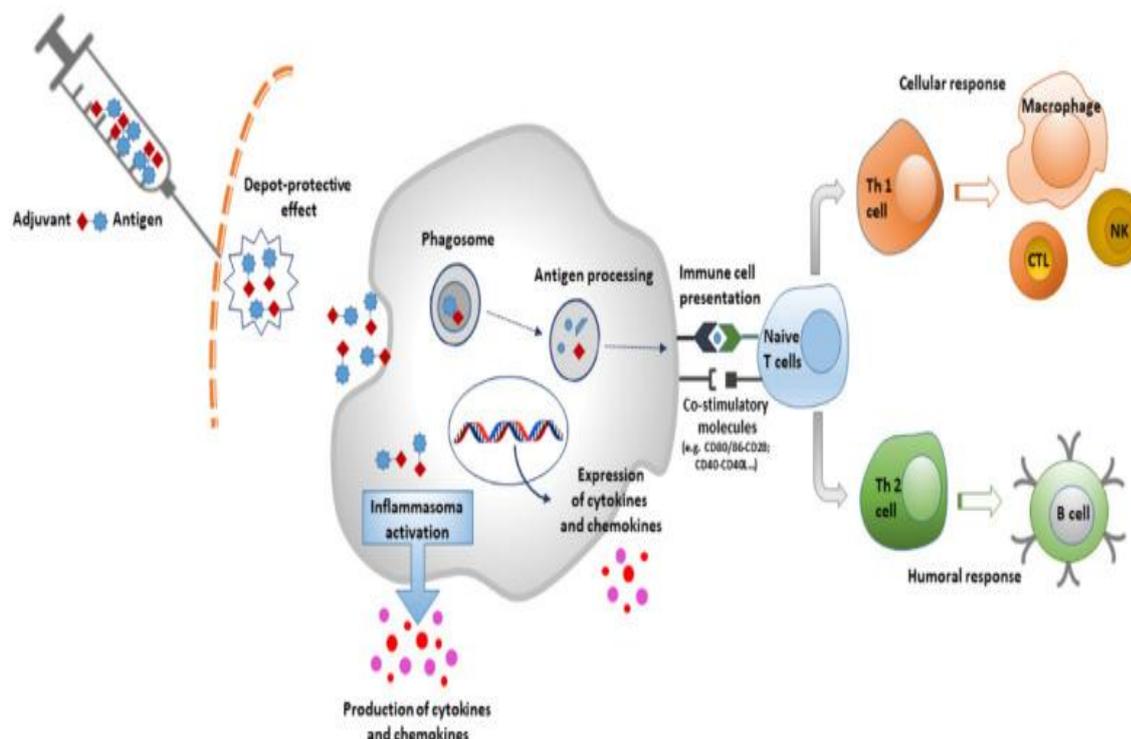


Figure 1.5. Signaux ciblé par adjuvants (Facciola et al, 2022)

1.5.3. Intérêt et le choix

1.5.3.1 intérêts de l'utilisation des adjuvants

Les adjuvants peuvent améliorer l'immunogénicité des antigènes faiblement immunogènes, moduler le type de réponse immunitaire générée, réduire la quantité d'antigène nécessaire à l'immunisation en une seule vaccination et réduire le nombre de rappels nécessaires (grâce à l'amélioration de la qualité de la réponse immunitaire). Il améliore la réponse immunitaire chez les personnes âgées, les nouveau-nés ou les personnes immunodéprimées (Coffman et al., 2010).

1.5.3.2. L'adjuvant idéal

L'adjuvant idéal doit regrouper les différentes qualités suivantes :

- Être puissant et non toxique (ou avoir une toxicité négligeable aux doses utilisées).
- Permet une mémoire immunologique supérieure ou une immunité à long terme.
- Être stable et apyrogène.
- N'induit pas d'auto-immunité.
- Non mutagène, non cancérigène (Marciani, 2003).

Revue de la littérature

1.6. Le bacille de Calmette-Guérin BCG

1.6.1 Histoire

La tuberculose est une maladie bactérienne infectieuse causée par *Mycobacterium tuberculosis* (MTb), qui se transmet entre humain par voie respiratoire et affecte le plus souvent les poumons. L'immunisation prophylactique est une stratégie clé pour réduire l'incidence de la tuberculose.

En 1908, le médecin Albert Calmette (1863-1933) et le vétérinaire Camille Guérin (1872-1961) commencent leurs travaux de recherche d'un vaccin au nouvel Institut Pasteur de Lille.

Bacillus Calmette-Guérin (BCG), le seul vaccin antituberculeux homologué, est une souche vivante atténuée de *Mycobacterium bovis* qui a été adopté par Calmette et Guérin il y a près de cent ans. Le BCG a été administré pour la première fois par voie orale en 1921, et depuis lors, de nombreux essais cliniques dans différentes parties du monde ont évalué l'efficacité du BCG dans la prévention de la tuberculose, le BCG est le vaccin le plus largement administrée et il fait généralement partie de la calendrier de vaccination systématique des nouveau nés, il peut être administré par voie intra cutanée ou intradermique (Okafor et *al.*, 2023).

Vaccin atténuée : Vaccins contenant le microbe en entier, sous forme atténuée. On parle de forme « atténuée » lorsqu'on manipule le microbe pour le rendre moins agressif, par exemple en réduisant sa capacité à se multiplier. C'est la méthode la plus efficace, mais aussi celle qui demande le plus de précautions. Les vaccins vivants atténués miment l'immunité naturelle, et déclenchent une réponse immunitaire plus forte et prolongée : après 1 ou 2 doses, ils ne nécessitent pas de vaccination de rappel.

Leur inconvénient principal est de ne pas pouvoir être administré (sauf exceptions) aux personnes dont le système immunitaire est affaibli par certaines maladies ou traitements médicaux (Canouï & Launay, 2019).

1.6.2. La fabrication

Albert Calmette et Camille Guérin étaient des chercheurs français qui ont travaillé à l'institut Pasteur. Leur objective était de développer un vaccin efficace contre la tuberculose ; ils ont cultivé la bactérie sur un milieu appelé Lowenstein-jensen, puis ont transféré une petite quantité de la culture sur un milieu frais. Cette technique de passage a été exécutée pendant plus de 13ans.

Après plusieurs passages répétés, les chercheuses ont observé que la souche devenait moins virulente pour les animaux de laboratoire ; ils ont constaté que cette souche atténuée ne provoquait plus les symptômes de la tuberculose aux les différentes espèces animales, mais était encore capable d'activer et générer une réponse immunitaire protectrice. La souche atténuée obtenue à la fin de cette expérience de passages répétés (230 passages) connue sous le nom de bacille de Calmette Guérin (Dannenberg Jr. & Rook, 1994)

Revue de la littérature

1.6.3. BCG et adjuvants

Une autre stratégie qui a été utilisée pour améliorer l'efficacité du BCG est l'utilisation d'adjuvants avec le BCG, dont des exemples incluent la clofazimine, la lactoferrine, l'inarigivir.

Lorsque le BCG était administré avec la clofazimine, un composé lipophile principalement utilisé pour traiter la lèpre, il était plus efficace que le BCG seul pour réduire la formation de granulomes lors de l'exposition au Mtb H37Rv chez la souris. Ce mécanisme s'est avéré être la capacité de la clofazimine à augmenter la fréquence des cellules souches telles que les cellules mémoire, les cellules mémoire centrales et les précurseurs des cellules mémoire effectrices.

De même, l'administration de lactoferrine humaine ou bovine en association avec le BCG chez la souris a induit une réponse Th1, diminué les UFC pulmonaires et protégé contre les lésions tissulaires induites par les agents pathogènes, réduisant ainsi l'exposition à la Mtb hautement toxique. Il a été démontré qu'il protégeait mieux les souris.

Un autre exemple de l'utilisation récente d'adjuvant est la petite molécule SB9200, ou inarigivir, qui améliore les réponses immunitaires antivirales médiées par RIG-1 et NOD-2. L'administration sous-cutanée d'inarigivir et de BCG a mieux protégé les souris contre la provocation par aérosol Mtb que le BCG seul (Ahmed et *al.*, 2021).

1.6.4. Mode d'action

L'immunisation par le BCG déclenche une réponse immunitaire continue qui se déploie au niveau du site d'injection, des ganglions lymphatiques, de la périphérie et même de la moelle osseuse.

Lorsque le BCG est administré par voie intradermique, il est reconnu par plusieurs PRRs tels que les TLR (Tol Like Receptor), NOD-2, CD11b, FcγRII, FcγRIII et les récepteurs du mannose, qui sont présents sur les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les DC, qui agissent comme des répondeurs précoces pour déclencher une réponse immunitaire. Les cytokines et les chimiokines sécrétées par les macrophages activés, les neutrophiles et les cellules dendritiques comprennent l'IL-6 (Interleukine 6), l'IL-8, le TNF-α (Facteur de Nécrose Tumorale), l'IL-12p40, le MIP-1α, le MIP-1β, le TGF-β (Transroeming Growth Factor Beta), etc.

Les antigènes BCG sont transportés du site de vaccination principalement via les CD vers les ganglions lymphatiques. Dans les ganglions lymphatiques, les CD présentent des antigènes BCG transformés à des lymphocytes T CD4+ et CD8+ spécifiques pour déclencher des réponses effectrices adaptatives.

En plus des lymphocytes T, les lymphocytes B sont également activés et se différencient en lymphocytes B plasmatiques producteurs d'anticorps.

Le BCG est également impliqué dans la génération d'une « immunité entraînée ». Il peut induire des changements épigénétiques dans les régions promotrices des monocytes, principalement des gènes de cytokines tels qu'IL-1β, IL-6 et TNF-α. Ces caractéristiques épigénétiques persistent longtemps après l'exposition initiale au BCG et persistent donc même après une provocation ou une attaque par des agents pathogènes totalement

Revue de la littérature

indépendants du BCG, comme une infection par les mycobacterium de BCG est capable de déclencher des réponses immunitaires plus efficaces (Ahmed et al., 2021).

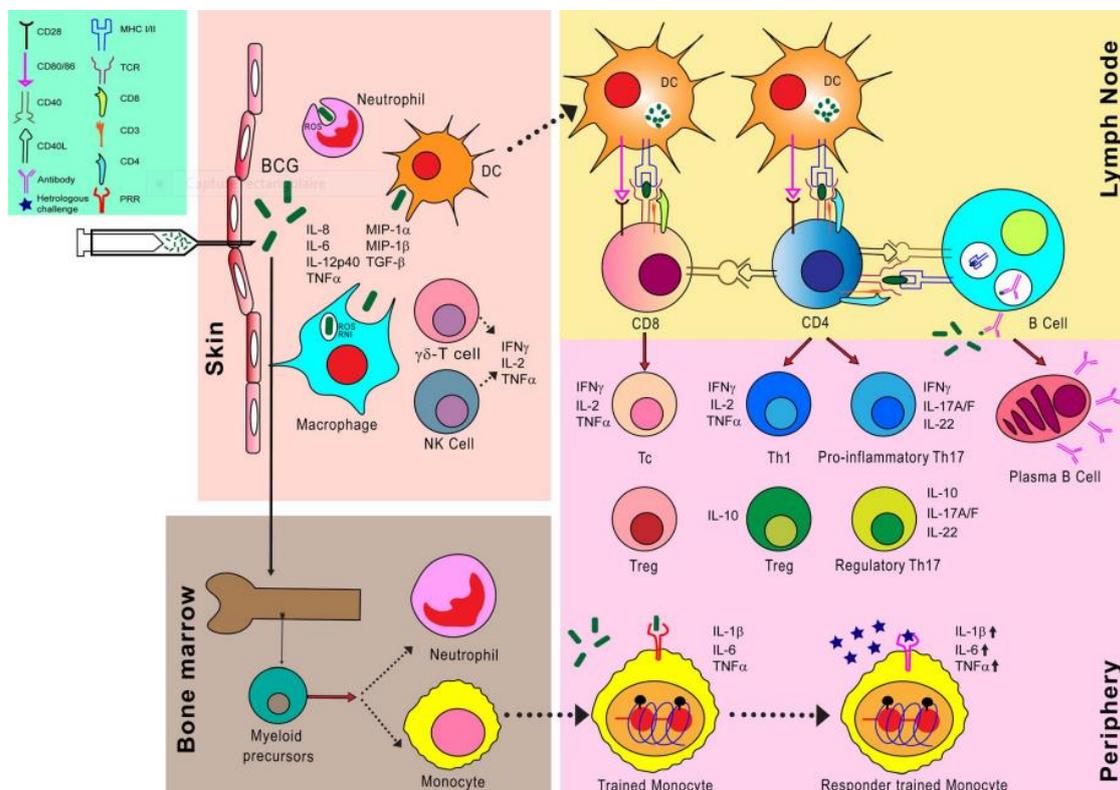


Figure 1.6. Les réponses immunitaires innées, adaptatives générées par le vaccin de BCG, (Ahmed et al., 2021)

1.6.5. L'efficacité de BCG

Le BCG, bien que recommandé pour son effet protecteur contre la tuberculose active, présente une plus grande efficacité dans la prévention des maladies disséminées chez les enfants que dans la prévention des maladies pulmonaires chez les adultes. Il n'offre aucune protection contre la réactivation de la tuberculose latente ni contre la transmission interhumaine de *Mtb*. Cependant, des études ont montré que le BCG a réduit la taille des foyers de tuberculose pulmonaires. (Yamazaki-Nakashimada et al., 2020).

La durée de la protection induite par le BCG n'est pas connue, bien qu'elle ait été précédemment considérée comme limitée aux premières années de la vie. Des études précédentes montrent que le BCG est efficace contre la tuberculose pendant au moins 20 ans lorsqu'il est administré à la naissance ou à l'âge scolaire.

Les mécanismes immunologiques de la protection induite par le BCG contre l'infection à *Mtb* ne sont pas complètement compris. La protection médiée par le BCG contre la tuberculose a été historiquement attribuée aux lymphocytes T CD4 + mémoires induits par le vaccin qui sécrètent rapidement des cytokines Th1 et contrôlent l'infection secondaire par *Mtb*. Cependant, il existe peu de preuves que les lymphocytes T CD4 + mémoires induits par le vaccin confèrent une protection contre la tuberculose chez les hôtes immunocompétents (Foster et al., 2021).

Revue de la littérature

La vaccination par le BCG améliore les réponses innées à des agents pathogènes non apparentés ; Les PBMCs isolées chez les adultes sains vaccinés par le BCG génèrent des niveaux accrus des cytokines de l'immunité innées TNF- α , IL-6 et IL-1 β en réponse à la stimulation avec le lysat de Mtb. La capacité élevée de production d'IL-1 β et de TNF- α a persisté pendant trois mois après la vaccination, revenant aux niveaux de référence dans les 12 mois. Après la vaccination, les monocytes ont également affiché une expression de surface accrue des marqueurs d'activation CD11b, CD14, CD206 et TLR4, et ces changements ont persisté pendant 12 mois. La vaccination par le BCG a également amélioré les réponses des cytokines des cellules NK deux semaines et trois mois après la vaccination(Foster *et al.*, 2021).

1.6.6. Les inconvénients de la BCG

Des événements tragiques ont été enregistrés dans les premiers jours de l'utilisation du BCG, avec un accident connu sous le nom de catastrophe de Lübeck en 1929-1933. Lors de cet événement dramatique, 251 nouveau-nés ont reçu par voie orale trois doses de vaccin BCG contaminé par le MTB. 173 nourrissons ont contracté la tuberculose et 72 sont décédés(Donald *et al.*, 2022).

La prévalence des complications liées au BCG dans la population générale est estimée à environ 1 vaccination sur 2 500 pour les complications locales (inflammation du BCG) et 1 sur 100 000 pour la maladie BCG disséminée. L'administration de BCG avec une maladie focale du BCG (inflammation du BCG) ou une maladie disséminée du BCG (maladie du BCG) chez les patients immunodéprimés est associée à des conséquences fatales.

Une complication particulière observée chez les patients infectés par le VIH est la présence d'un syndrome de reconstitution immunitaire inflammatoire induit par le BCG après une thérapie rétrovirale.

Les défauts affectant l'immunité à médiation cellulaire, la fonction phagocytaire et l'immunité médiée par l'IFN- γ ont été classiquement associés à des complications de la vaccination par le BCG. Les données de 349 patients vaccinés par le BCG présentant un déficit immunitaire combiné sévère ont montré que 51 % avaient des complications du BCG et 34 % avaient une maladie disséminée (33 000 fois dans la population générale).

Le BCG protège les enfants contre la tuberculose miliaire et la méningite tuberculeuse, mais est moins efficace chez les adultes car il offre une protection faible et irrégulière contre la tuberculose pulmonaire, principale source de transmission de la tuberculose. Le BCG ne confère pas d'immunité protectrice à vie contre la tuberculose(Yamazaki-Nakashimada *et al.*, 2020).

Revue de la littérature

1.7. Bromélaïne

1.7.1. Définition de bromélaïne

La bromélaïne, est une enzyme de digestion des protéines disponible dans le commerce, elle est dérivée du fruit ou de la tige de l'ananas (Agrawal et *al.*, 2022).

L'ananas, connu en botanique sous le nom d'*Ananas comosus*, est utilisée comme médicament traditionnel par les habitants indigènes d'Amérique centrale et du Sud depuis des siècles (Amini et *al.*, 2016). Le premier scientifique à avoir isolé la bromélaïne est un chimiste vénézuélien du nom de Vicente Marcano en 1891 (Dighe, Nachiket S., et *al.*) (Chittenden, 1893).

1.7.2. Caractéristiques biochimiques

La bromélaïne (Br) est un composé thérapeutique non toxique classé comme protéase, une enzyme digérant les protéines. Heinecke révélant en 1957 que la tige d'ananas contenait beaucoup plus de bromélaïne que le fruit réel (Abreu & Figueiredo, 2019).

La bromélaïne de tige (SBM) a une structure secondaire stable (Agrawal et *al.*, 2022). Le pH approprié se situe entre 6 et 7 et la plage de température optimale est de 50 à 60°C (Agrawal et *al.*, 2022; Hikisz & Bernasinska-Slomczewska, 2021); la plage de poids moléculaire pour SBM est de 26 à 37 kDa(Hikisz & Bernasinska-Slomczewska, 2021).

1.7.3. Les applications cliniques

Actuellement, la bromélaïne est administrée pour de nombreuses applications cliniques en raison de ses effets (Rathnavelu et *al.*, 2016) et des propriétés qui ont bénéfiques au système immunitaire.

La bromélaïne a un double effet dans la modulation des réponses immunitaires qui sont importantes pour maintenir le bon fonctionnement du système immunitaire et la prévention de l'homéostasie. Selon le microenvironnement cellulaire, la présence de conditions inflammatoires et, finalement, la santé générale, la bromélaïne peut entraîner à la fois une augmentation et une diminution de l'activité/expression des mêmes molécules impliquées dans la réponse immunitaire (Hikisz & Bernasinska-Slomczewska, 2021).

1.7.4. Avantages

En raison de ses bonnes fonctions biologiques, de l'absence de la cytotoxicité systémique et des avantages souvent excellents qu'elle offre, la bromélaïne a été utilisée de manière permanente dans de nombreuses industries, telles que la cosmétologie, la pharmacie, l'alimentation et la biotechnologie.

Des études cliniques ont montré que la bromélaïne aide à traiter une variété de troubles et a un impact significatif sur l'immunité et la santé humaines. Elle est efficace dans le traitement de plusieurs maladies telles que le cancer, l'inflammation et l'arthrose. Il est considéré comme une enzyme précieuse dans le domaine thérapeutique. La bromélaïne agit indirectement pour bloquer spécifiquement la formation de prostaglandines pro-inflammatoires. Jusqu'à présent, la bromélaïne s'est avéré bien absorbé par l'organisme après administration orale et sans effets secondaires importants, même après une utilisation à long terme(Hikisz & Bernasinska-Slomczewska, 2021).

1.8. Les voies métaboliques

1.8.1. Voie de signalisation liée au glucose

Les cellules immunitaires reprogramment les voies métaboliques pour répondre aux demandes d'énergie et de biosynthèse lors de l'activation, le métabolisme du glucose étant le processus principal. Lors de l'entrée dans la cellule, le glucose peut libérer de l'énergie par phosphorylation oxydative ou fermentation. Dans le cytosol, le glucose est converti en pyruvate par une série d'enzymes de glycolyse (Masutin et al., 2022).

Le pyruvate est à la croisée des chemins entre la phosphorylation oxydative et la fermentation. À son entrée dans les mitochondries, le pyruvate subit le cycle TCA pour générer du dioxyde de carbone et de l'eau, produisant 36 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) par molécule de glucose (Figure 1.6). En revanche, seuls deux ATP sont générés lorsque le pyruvate est réduit en lactate par le lactate déshydrogénase (LDH) dans le cytoplasme (Sanjaya et al., 2021).

La LDH est une enzyme tétramérique avec deux sous-unités principales, LDHA et LDHB. LDHA code pour LDHA, qui catalyse la conversion du pyruvate en lactate, et l'oxydation du nicotinamide adénine dinucléotide déshydrogénase (NADH) en NAD^+ . LDHB est codé par LDHB et est responsable de la conversion du lactate en pyruvate (Ye et al., 2022a).

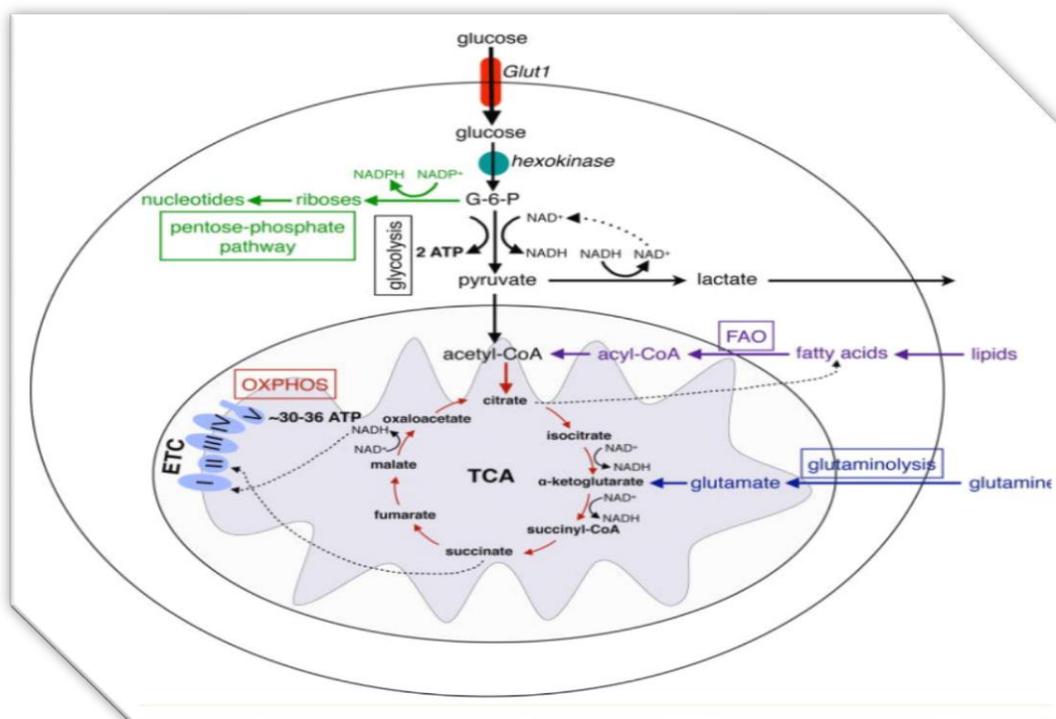


Figure 1.7. Principales voies métaboliques des cellules immunitaires, (Ganeshan & Chawla, 2014)

1.8.2. Voie de signalisation liée au calcium

Le Ca^{2+} est le messager intracellulaire le plus polyvalent découvert à ce jour, puisqu'il est impliqué dans la régulation de presque toutes les fonctions et réactions cellulaires connues (Petersen et al., 2005).

Les cellules utilisent une «boîte à outils» de canaux, de pompes et de tampons cytosoliques pour contrôler les niveaux de calcium (Berridge et al. 2000). De nombreuses protéines sont modulées directement ou indirectement par le calcium. Ceux-ci comprennent les kinases et les phosphatases, les facteurs de transcription tels que NF-AT et la calmoduline (CaM), protéine de liaison au calcium omniprésente (Bootman, 2012) (Figure 1.7).

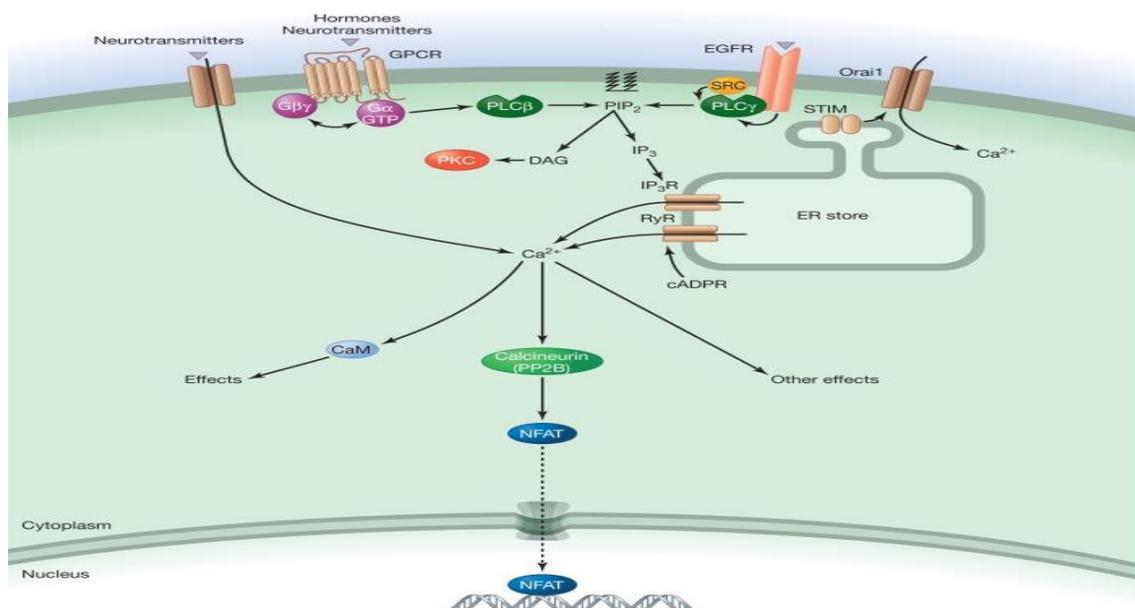


Figure 1.8. Signalisation calcique, (Bootman, 2012)

1.8.3. Activation de système immunitaire liée au cholestérol

Le cholestérol est un lipide non soluble de la famille des stérols, il est un constituant membranaire essentiel qui entoure la cellule, Il est également responsable du maintien de la rigidité de la membrane cellulaire et la diffusion latérale des lipides et des protéines, c'est pour ça il possède la capacité d'assurer le recrutement des monocytes sur la surface endothéliale enflammée (Saha et al. 2017), il est synthétisé à partir de l'acétyl-CoA dans une voie impliquant au moins 20 enzymes (Griffiths & Wang, 2021)

Le cholestérol est requis par toutes les membranes cellulaires, ce qui rend ses voies biosynthétiques et régulatrices omniprésentes dans tous les types de cellules, y compris les cellules immunitaires. Des études récentes mettent en évidence le rôle émergent du cholestérol en tant que régulateur important de l'activité immunitaire innée et adaptative (Aguilar-Ballester et al., 2020a). Joue un rôle essentiel dans l'immunité entraînée, qui est une forme d'immunité adaptative à long terme acquise par le système immunitaire. L'immunité entraînée fait référence à la capacité du système immunitaire à se souvenir des infections passées et à monter une réponse plus rapide et plus forte lors d'une exposition ultérieure à l'agent pathogène.

Revue de la littérature

Il contribue à la formation de rafts lipidiques et de synapses immunologiques. Ces structures sont essentielles pour la reconnaissance des pathogènes, la signalisation intracellulaire et la coordination de la réponse immunitaire lors de l'immunité entraînée.

Problématique et Objective

1. Problématique

Malgré des efforts d'éradication agressifs, la tuberculose (TB) reste un fardeau mondial pour la santé, qui affecte de manière disproportionnée les pays les plus pauvres et les moins développés. Le vaccin Bacille de Calmette et Guérin (BCG) est le seul vaccin approuvé pour la tuberculose, qui peut réduire la mortalité infantile en assurant une protection immunitaire contre TB et d'autres maladies respiratoires chez l'enfant, cependant, il demeure inefficace chez les adultes et son rendement reste controversé, ainsi, le BCG peut également provoquer des effets indésirables chez les personnes immunodéprimées. De ce fait, il est nécessaire d'améliorer l'efficacité du BCG, avec une stratégie qui consiste à booster le BCG à l'aide des immunomodulateurs.

La bromélaïne est une enzyme protéolytique chimiosensible naturelle efficace dérivée des tiges d'ananas, elle est utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle pour ses propriétés thérapeutiques et digestives, Elle a des effets positifs sur les systèmes respiratoire, digestif et circulatoire, et potentiellement sur le système immunitaire et ne présentent aucun effet secondaire indésirable remarquable. De plus, elle a un effet immunomodulateur cela lui confère le caractère adjuvant selon les caractéristiques d'adjuvantité. Dans cette optique, nous avons pensé à tester l'effet adjuvant de la bromélaïne sur le métabolisme du glucose, calcium et cholestérol, voire la signalisation cellulaire des PBMCs traitées par le BCG.

2. But

Nous avons essayé de montrer que la bromélaïne pourrait avoir un effet adjuvant sur le métabolisme du glucose, calcium et cholestérol, et la signalisation cellulaire des PBMCs traitées par le BCG.

3. Objective

Evaluation de l'effet *ex-vivo* de la bromélaïne sur le calcium, glucose et cholestérol intracellulaire des PBMCs traitées par BCG.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Chapitre 3 : Résultats et interprétation

Chapitre 4 : Discussion

CONFIDENTIEL

Résultats et interprétation

Chapitre 5. Conclusions et perspectives

De nos jours, le BCG a connu plusieurs échecs qui peuvent être liés à des conditions

imprévisibles, de la latitude géographique, du fond génétique de l'hôte et de la souche de BCG utilisée. De plus, il assure une protection auprès de 50 % seulement, et il est inefficace pour fournir une protection contre la tuberculose pulmonaire chez les adultes.

La bromélaïne, une molécule immunomodulatrice par excellence, répond parfaitement au critère d'adjuvantité, et elle est une molécule naturelle à cent pour cent et ne présente aucune toxicité ou d'effet secondaire indésirable remarquable, ce qui la qualifie d'excellent adjuvant.

Ce qui nous a menés à étudier l'effet adjuvant de bromélaïne sur l'activation des PBMCs traitées par BCG. Cette présente étude rapporte l'effet de la bromélaïne sur le glucose, calcium et cholestérol intracellulaire des PBMCs.

D'après les résultats que nous avons obtenus grâce à cette recherche établie au niveau du laboratoire BIOMOLIM de l'université de Tlemcen, nous avons conclu que la Bromélaïne a un effet anti-inflammatoire en modulant le métabolisme cellulaire pour diminuer la réaction inflammatoire contre le vaccin de BCG.

En ce qui concerne différentes perspectives, plusieurs expériences seront menées afin d'examiner de manière approfondie le destin du glucose, du calcium et du cholestérol en étudiant la signalisation intracellulaire.

Chapitre 6. Bibliographie et Références

- Aaby, P., Roth, A., Ravn, H., Napirna, B. M., Rodrigues, A., Lisse, I. M., Stensballe, L., Diness, B. R., Lausch, K. R., Lund, N., Biering-Sørensen, S., Whittle, H., & Benn, C. S. (2011). Randomized trial of BCG vaccination at birth to low-birth-weight children : Beneficial nonspecific effects in the neonatal period? *The Journal of Infectious Diseases*, *204*(2), 245-252.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jir240>
- Abreu, D. C. A., & Figueiredo, K. C. de S. (2019). BROMELAIN SEPARATION AND PURIFICATION PROCESSES FROM PINEAPPLE EXTRACT. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *36*, 1029-1039. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190362s20180417>
- Agrawal, P., Nikhade, P., Patel, A., Mankar, N., & Sedani, S. (2022). Bromelain : A Potent Phytomedicine. *Cureus*, *14*(8), e27876. <https://doi.org/10.7759/cureus.27876>
- Aguilar-Ballester, M., Herrero-Cervera, A., Vinué, Á., Martínez-Hervás, S., & González-Navarro, H. (2020a). Impact of Cholesterol Metabolism in Immune Cell Function and Atherosclerosis. *Nutrients*, *12*(7), 2021. <https://doi.org/10.3390/nu12072021>
- Aguilar-Ballester, M., Herrero-Cervera, A., Vinué, Á., Martínez-Hervás, S., & González-Navarro, H. (2020b). Impact of Cholesterol Metabolism in Immune Cell Function and Atherosclerosis. *Nutrients*, *12*(7), 2021. <https://doi.org/10.3390/nu12072021>
- Ahmed, A., Rakshit, S., Adiga, V., Dias, M., Dwarkanath, P., D'Souza, G., & Vyakarnam, A. (2021). A century of BCG : Impact on tuberculosis control and beyond. *Immunological Reviews*, *301*(1), 98-121. <https://doi.org/10.1111/imr.12968>
- Alving, C. R., Peachman, K. K., Rao, M., & Reed, S. G. (2012). Adjuvants for human vaccines. *Current Opinion in Immunology*, *24*(3), 310-315. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.03.008>
- Amini, A., Masoumi-Moghaddam, S., & Morris, D. L. (2016). Bromelain. In A. Amini, S. Masoumi-Moghaddam, & D. L. Morris (Éds.), *Utility of Bromelain and N-Acetylcysteine in Treatment of Peritoneal Dissemination of Gastrointestinal Mucin-Producing Malignancies* (p. 63-80). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28570-2_3

- André, F. E. (2003). Vaccinology : Past achievements, present roadblocks and future promises. *Vaccine*, 21(7-8), 593-595. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00702-8](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00702-8)
- Arts, R. J. W., Carvalho, A., La Rocca, C., Palma, C., Rodrigues, F., Silvestre, R., Kleinnijenhuis, J., Lachmandas, E., Gonçalves, L. G., Belinha, A., Cunha, C., Oosting, M., Joosten, L. A. B., Matarese, G., van Crevel, R., & Netea, M. G. (2016). Immunometabolic Pathways in BCG-Induced Trained Immunity. *Cell Reports*, 17(10), 2562-2571. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.011>
- Baba, Y., & Kurosaki, T. (2016). Role of Calcium Signaling in B Cell Activation and Biology. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 393, 143-174. https://doi.org/10.1007/82_2015_477
- Baxter, D. (2007). Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occupational Medicine*, 57(8), 552-556. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqm110>
- Belhassena, I., Nouari, W., Messaoud, A., Nouar, M., Brahimi, M., Lamara, S.-A. C., & Aribi, M. (2020a). Aspirin enhances regulatory functional activities of monocytes and downregulates CD16 and CD40 expression in myocardial infarction autoinflammatory disease. *International Immunopharmacology*, 83, 106349. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106349>
- Belhassena, I., Nouari, W., Messaoud, A., Nouar, M., Brahimi, M., Lamara, S.-A. C., & Aribi, M. (2020b). Aspirin enhances regulatory functional activities of monocytes and downregulates CD16 and CD40 expression in myocardial infarction autoinflammatory disease. *International Immunopharmacology*, 83, 106349. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106349>
- Biering-Sørensen, S., Aaby, P., Napirna, B. M., Roth, A., Ravn, H., Rodrigues, A., Whittle, H., & Benn, C. S. (2012). Small randomized trial among low-birth-weight children receiving bacillus Calmette-Guérin vaccination at first health center contact. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 31(3), 306-308. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3182458289>
- Bootman, M. D. (2012). Calcium Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(7), a011171. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011171>

- Boradia, V., Frando, A., & Grundner, C. (2022). The Mycobacterium tuberculosis PE15/PPE20 complex transports calcium across the outer membrane. *PLOS Biology*, *20*(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001906>
- Canoui, E., & Launay, O. (2019). [History and principles of vaccination]. *Revue Des Maladies Respiratoires*, *36*(1), 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2018.02.015>
- Chakraborty, A. J., Mitra, S., Tallei, T. E., Tareq, A. M., Nainu, F., Cicia, D., Dhama, K., Emran, T. B., Simal-Gandara, J., & Capasso, R. (2021). Bromelain a Potential Bioactive Compound : A Comprehensive Overview from a Pharmacological Perspective. *Life*, *11*(4), 317.
<https://doi.org/10.3390/life11040317>
- Chaudhari, T. (2021). Vaccinations in the newborn. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, *76*, 66-82. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2020.09.004>
- Chittenden, R. H. (1893). On the Proteolytic Action of Bromelin, the Ferment of Pineapple Juice. *The Journal of Physiology*, *15*(4), 249-310. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1893.sp000474>
- Coffman, R. L., Sher, A., & Seder, R. A. (2010). Vaccine adjuvants : Putting innate immunity to work. *Immunity*, *33*(4), 492-503. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>
- Dahmani, Z., Addou-Klouche, L., Gizard, F., Dahou, S., Messaoud, A., Chahinez Djebri, N., Benaissi, M. I., Mostefaoui, M., Terbeche, H., Nouari, W., Miliani, M., Lefranc, G., Fernandez, A., Lamb, N. J., & Aribi, M. (2020). Metformin partially reverses the inhibitory effect of co-culture with ER-/PR-/HER2+ breast cancer cells on biomarkers of monocyte antitumor activity. *PLoS One*, *15*(10), e0240982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240982>
- Dahou, S., Smahi, M. C.-E., Nouari, W., Dahmani, Z., Benmansour, S., Ysmail-Dahlouk, L., Miliani, M., Yebdri, F., Fakir, N., Laoufi, M. Y., Chaib-Draa, M., Tourabi, A., & Aribi, M. (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*, 107476.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107476>

- Dannenberg Jr., A. M., & Rook, G. A. W. (1994). Pathogenesis of Pulmonary Tuberculosis : An Interplay of Tissue-Damaging and Macrophage-Activating Immune Responses—Dual Mechanisms That Control Bacillary Multiplication. In *Tuberculosis* (p. 459-483). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1128/9781555818357.ch27>
- Donald, P., Kaufmann, S., Thee, S., Mandalakas, A. M., & Lange, C. (2022). Pathogenesis of tuberculosis : The 1930 Lübeck disaster revisited. *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society*, *31*(164), 220046. <https://doi.org/10.1183/16000617.0046-2022>
- Espinosa, E., & Chillet, P. (2006). *Immunologie*. ELLIPSES.
- Facciola, A., Visalli, G., Laganà, A., & Di Pietro, A. (2022). An Overview of Vaccine Adjuvants : Current Evidence and Future Perspectives. *Vaccines*, *10*(5), 819. <https://doi.org/10.3390/vaccines10050819>
- Foster, M., Hill, P. C., Setiabudiawan, T. P., Koeken, V. A. C. M., Alisjahbana, B., & van Crevel, R. (2021). BCG-induced protection against Mycobacterium tuberculosis infection : Evidence, mechanisms, and implications for next-generation vaccines. *Immunological Reviews*, *301*(1), 122-144. <https://doi.org/10.1111/imr.12965>
- Griffiths, W. J., & Wang, Y. (2021). Sterols, Oxysterols, and Accessible Cholesterol : Signalling for Homeostasis, in Immunity and During Development. *Frontiers in Physiology*, *12*, 723224. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.723224>
- Hale, L. P., Greer, P. K., & Sempowski, G. D. (2002). Bromelain treatment alters leukocyte expression of cell surface molecules involved in cellular adhesion and activation. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, *104*(2), 183-190. <https://doi.org/10.1006/clim.2002.5254>
- Hikisz, P., & Bernasinska-Slomczewska, J. (2021). Beneficial Properties of Bromelain. *Nutrients*, *13*(12), 4313. <https://doi.org/10.3390/nu13124313>
- Justiz Vaillant, A. A., & Grella, M. J. (2023). Vaccine (Vaccination). In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532895/>

- Kashyap, R. S., Husain, A. A., Morey, S. H., Panchbhai, M. S., Deshpande, P. S., Purohit, H. J., Taori, G. M., & Daginawala, H. F. (2010). Assessment of immune response to repeat stimulation with BCG vaccine using in vitro PBMC model. *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines*, 8(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1476-8518-8-3>
- Marciani, D. J. (2003). Vaccine adjuvants : Role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discovery Today*, 8(20), 934-943. [https://doi.org/10.1016/s1359-6446\(03\)02864-2](https://doi.org/10.1016/s1359-6446(03)02864-2)
- Marcotte, H., & Hammarström, L. (2015). Passive Immunization. *Mucosal Immunology*, 1403-1434. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00071-9>
- Masutin, V., Kersch, C., & Schmitz-Spanke, S. (2022). A systematic review : Metabolomics-based identification of altered metabolites and pathways in the skin caused by internal and external factors. *Experimental Dermatology*, 31(5), 700-714. <https://doi.org/10.1111/exd.14529>
- Muhammad, Z. A., & Ahmad, T. (2017). Therapeutic uses of pineapple-extracted bromelain in surgical care—A review. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 67(1), 121-125.
- Nouari, W., Ysmail-Dahlouk, L., & Aribi, M. (2016). Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*. *International Immunopharmacology*, 30, 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.11.033>
- Okafor, C. N., Rewane, A., & Momodu, I. I. (2023). *Bacillus Calmette Guerin*. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538185/>
- Pavia, C. S., & Wormser, G. P. (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>
- Petersen, O. H., Michalak, M., & Verkhatsky, A. (2005). Calcium signalling : Past, present and future. *Cell Calcium*, 38(3), 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.023>
- Pommier, A. J. C., Alves, G., Viennois, E., Bernard, S., Communal, Y., Sion, B., Marceau, G., Damon, C., Mouzat, K., Caira, F., Baron, S., & Lobaccaro, J. M. A. (2010). Liver X Receptor activation

- downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene*, 29(18), 2712-2723. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.30>
- Pulendran, B. (2014). Systems vaccinology : Probing humanity's diverse immune systems with vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(34), 12300-12306. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400476111>
- Qu, M., Zhou, X., & Li, H. (s. d.). BCG vaccination strategies against tuberculosis : Updates and perspectives. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 17(12), 5284-5295. <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.2007711>
- Rahlwes, K. C., Dias, B. R. S., Campos, P. C., Alvarez-Arguedas, S., & Shiloh, M. U. (2023). Pathogenicity and virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Virulence*, 14(1), 2150449. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2150449>
- Rathnavelu, V., Alitheen, N. B., Sohila, S., Kanagesan, S., & Ramesh, R. (2016). Potential role of bromelain in clinical and therapeutic applications. *Biomedical Reports*, 5(3), 283-288. <https://doi.org/10.3892/br.2016.720>
- Richardson, A., & Fedoroff, S. (1997). Quantification of Cells in Culture. In S. Fedoroff & A. Richardson (Éds.), *Protocols for Neural Cell Culture* (p. 219-233). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2586-5_16
- Sanjaya, A., Goenawan, H., Setiawan, I., Gunadi, J. W., Limyati, Y., & Lesmana, R. (2021). Elaborating the Physiological Role of YAP as a Glucose Metabolism Regulator:A Systematic Review. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 55(2), 193-205. <https://doi.org/10.33594/000000359>
- Shehata, M., & Stingl, J. (2017). Purification of Distinct Subsets of Epithelial Cells from Normal Human Breast Tissue. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1501, 261-276. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6475-8_13

- Smith, K. A. (2012). Louis Pasteur, the Father of Immunology? *Frontiers in Immunology*, 3, 68.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00068>
- Swaminathan, N., Perloff, S. R., & Zuckerman, J. M. (2021). Prevention of Mycobacterium tuberculosis Transmission in Health Care Settings. *Infectious Disease Clinics of North America*, 35(4), 1013-1025. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.07.003>
- Swulius, M. T., & Waxham, M. N. (2008). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 65(17), 2637-2657. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8086-2>
- Tuells, J. (2012). Vaccinology : The name, the concept, the adjectives. *Vaccine*, 30(37), 5491-5495.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.059>
- Vineeta, N., Gupta, S., & Chandra, A. (2014). Retrievability of calcium hydroxide intracanal medicament with Chitosan from root canals : An in vitro CBCT volumetric analysis. *Journal of Conservative Dentistry : JCD*, 17(5), 454-457. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.139838>
- Yamazaki-Nakashimada, M. A., Unzueta, A., Berenise Gámez-González, L., González-Saldaña, N., & Sorensen, R. U. (2020). BCG : A vaccine with multiple faces. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 16(8), 1841-1850. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1706930>
- Ye, L., Jiang, Y., & Zhang, M. (2022a). Crosstalk between glucose metabolism, lactate production and immune response modulation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 68, 81-92.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2022.11.001>
- Ye, L., Jiang, Y., & Zhang, M. (2022b). Crosstalk between glucose metabolism, lactate production and immune response modulation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 68, 81-92.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2022.11.001>

