

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :
Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Immuno-toxicologie

Présentée et soutenue par :

Julie Seeboth

le : vendredi 25 octobre 2013

Titre :

Impact des trichothécènes sur l'immunité des muqueuses et utilisation de
Lactobacillus sobrius comme moyen de lutte microbiologique contre ces
mycotoxines

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

UMR 1331 TOXALIM

Directeur(s) de Thèse :

Laurence Guzylack-Piriou, INRA
DR Claire ALBASI, INP-ENSIACET-LGC

Rapporteurs :

Fabrice Laurent, INRA
Dominique Parent-Massin, Université Bretagne Occidentale

Membre(s) du jury :

Alain Periquet - Président, Université Paul Sabatier

Remerciements

Ce travail de recherche a été possible grâce à un partenariat entre le Ministère National Français pour la Recherche, le laboratoire d'Immuno-Mycotoxicologie de l'Institut National pour la Recherche Agronomique (INRA – UMR 1331), l'Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT) et l'école doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB).

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont accepté de faire partie de ce jury :

- Le Dr. Fabrice Laurent et le Dr. Dominique Parent-Massin, qui ont accepté d'évaluer ce travail en qualité de rapporteur.
- Le Pr. Alain Périquet, qui a accepté d'être Président de l'ensemble de ce Jury.

Je tiens tout particulièrement à adresser mes remerciements au **Dr. Laurence Guzylack-Piriou**, ma directrice de thèse pour l'ensemble de tes qualités scientifiques : la pertinence de tes conseils, ton implication dans l'ensemble des expérimentations animales réalisées et dans la rédaction de l'ensemble des productions scientifiques au cours de ces 3 longues années. Mais je souhaite également te remercier pour l'ensemble de tes qualités humaines : ta compréhension, ta disponibilité (même en vacances et pendant tes week-ends), ta capacité à me pousser et à me « booster » dans les moments difficiles mais surtout, le plus important : Merci pour ton soutien infaillible et ta confiance.

Je tiens à adresser tous mes remerciements, ma sympathie et mon affection aux personnes qui ont partagé avec moi – de près ou de loin – ces 3 ans de travail.

A l'INRA de St Martin du Touch :

Au personnel de l'équipe :

Le Dr. Isabelle Oswald, directrice de l'équipe d'Immuno-mycotoxicologie, pour son accueil au sein de cette équipe, sa disponibilité et son implication dans mes nombreux déplacements m'ayant permis d'exposer mes résultats à la communauté scientifique.

Philippe, merci pour ta disponibilité et pour l'ensemble de tes compétences professionnelles aussi bien dans le cadre des expérimentations animales que pour ton implication dans la relecture de ma thèse et l'ensemble de tes remarques judicieuses lors de mes présentations orales.

Joëlle, je tenais à te remercier tout d'abord pour l'ensemble des commandes d'anticorps que tu as passées pour moi « à la dernière minute ». Merci aussi d'avoir été une oreille attentive dans les moments les plus difficiles et merci pour toutes nos discussions au déjeuner et au café que ce soit sur la tarification des sites du co-voiturage, le jardinage ou les festivals de musique... . Ces conversations me manqueront et je me rappellerai plus de ça que de notre « affreux » voyage en voiture à Brest! ☺

Anne-Marie, sans qui les expérimentations animales et les prises de sang qui n'auraient pas été possibles. Merci pour ton professionnalisme et pour toutes ces pauses partagées à discuter avec toi.

Thierry, je tenais à te remercier pour l'ensemble des compétences que tu m'as faites partager. Merci de m'avoir tout appris en cytométrie de flux et merci pour l'ensemble des relectures de mes articles, thèse et de tout le reste qui ont apporté un regard extérieur sur mon travail.

Christiane, merci également à toi pour ton soutien, la relecture d'une partie de ma thèse et la correction des nombreuses fautes d'orthographe.

Olivier, merci également à toi pour tes remarques constructives et pertinentes dans mon travail, ton soutien et ta capacité à toujours t'être intéressé à mon travail.

Je remercie également tous les autres membres permanents de l'équipe pour leurs bonnes humeurs et leurs disponibilités : Jean-Denis, Sylviane et Soraya.

Je remercie également la multitude des étudiants (courtes, moyennes et longues durées) avec lesquels j'ai pu travailler et échanger de nombreux fous rires. Je tiens à vous remercier pour tous ces moments agréables passés au ou en dehors du labo en votre compagnie : Haute-claire, Julien, Duncan, Maxime, Sophie, Roberta.

Je souhaite également bon courage à la relève : Charbel, Sophal et Joanna, Rhoda (merci pour tes cours d'anglais et de libannais ☺) et souhaite aussi beaucoup de courage à tous les prochains qui devront rédiger leur thèse : Alix, Selma, Im', Mélanie.

Sans oublier 68, ce petit porcelet pour lequel je me suis prise d'affection et qui lui aussi a fait pendant un temps partie de cette équipe...

Au personnel du pôle ToxAlim :

Un merci tout particulier à Pascal Martin et Yannick Lippi pour leur aide sur le plateau de transcriptomique qui ont indirectement participé à la réalisation et à la réussite de nos projets.

Un merci également à Afi qui m'a tout appris en microbiologie et qui m'a permis de réaliser une partie de ce travail.

Je tiens également à remercier Sandrine Ménard pour son implication dans nos expérimentations en chambre d'Ussing et l'ensemble de ses conseils et de ses remarques en tant que membre de mon comité de thèse qui m'ont permis d'élargir mes connaissances et compétences scientifiques.

Enfin merci à tous ceux que j'ai pu croiser et qui ont contribué à faire de cette thèse une agréable expérience jusqu'au bout. Je pense en particulier à Nicolas, Jean-Luc, Hervé, Arnaud.

Aux collaborateurs:

Merci aux membres de mon comité de thèse : le Dr. Sandrine Ménard, le Dr. Gilles Foucras et le Dr. Nicolas Bertho pour leur déplacement au cours de ces années, leur réflexion scientifique autour de cette thématique de recherche et l'apport de leur expertise dans le seul but de m'aider dans ma démarche scientifique et de donner de la pertinence à ce travail de recherche.

Merci également au Dr. François Meurens de l'INRA de Tours pour son expertise à travers les anses intestinales que nous avons réalisées à l'occasion d'une collaboration.

Aux amis:

Ces 3 ans ne se seraient pas aussi bien passés si je n'avais pas été entourée de tous mes amis.

Tout d'abord, il y a toi « ma grumelle » qui m'a soutenue, écoutée et sortie de nombreuses difficultés tout au long de ces trois longues années. Merci pour toutes nos

soirées musicales et non musicales à refaire le monde et pour tous nos trips surf qui m'ont permis de me vider l'esprit aux moments les plus inattendus.

Merci aussi à tous mes amis d'enfance de Toulouse qui ont eux aussi « saturés » de m'entendre parler de ma thèse sans en voir jamais la fin. Aujourd'hui c'est fini et je tiens à remercier tout particulièrement Nathalie ma « sister » et amie d'un soutien infailible qui m'a toujours remonté le moral et fait tellement rire pendant ces 3 ans. Je pense aussi à Christelle, Lucie et Laure (même si tu étais en Chine, tu m'as toujours soutenue).

Merci également à mes amis d'enfance de Paris pour leur gentillesse et leur soutien. Je pense notamment à Elodie, Michael et Laura (merci pour ce merveilleux voyage en Guadeloupe 😊)

Merci à tous mes colocataires Toulousains incroyables avec lesquels j'ai partagé toutes ses soirées, crémaillères et apéros: Tanguy, Benjamin et notre attaque de mites alimentaires mais aussi à Charles.

[A la famille :](#)

Et enfin, je dédie tout spécialement mon travail de thèse à ma maman Françoise et à mon papa Bernard à qui je dois la réussite de ce travail. Merci pour tout votre soutien et merci de croire en moi comme vous le faites.

Merci aussi à mon petit frère, Thomas qui m'a si souvent vu derrière un ordinateur en croyant que je jouais ou que j'étais sur facebook.

Et bien sûr, je n'oublie pas ma tante Brigitte et mes cousins Guigui et Alexandre avec qui j'ai partagé de merveilleux voyages au cours de ces 3 dernières années.

Sans oublier bien entendu, Sylvie et Amar, ma seconde famille qui m'êtes si chers.

Pour finir, je tiens à remercier tout particulièrement mon « professeur particulier de surf » réunionnais pour m'avoir encouragé à finir ce travail et m'avoir aidé à croire en moi jusqu'au bout. Merci pour ton amour.

TABLE DES MATIERES

Liste des figures	3
Liste des tableaux	5
Abréviations	7
Résumé	9
Listes des publications et des communications	11
Contexte de l'étude	15
Rappels bibliographiques	17
Chapitre 1 : Les réponses immunitaires des muqueuses	17
A. Maintien de l'homéostasie au sein des muqueuses	17
B. Les acteurs immunitaires présents dans les tissus associés aux muqueuses	21
1. Les cellules épithéliales	21
2. Les cellules présentatrices de l'antigène (CPA)	27
2.1. Ontogénèse des cellules présentatrices de l'antigène (CPA)	28
2.2. Les macrophages	29
2.2.1. Localisation et phénotype	29
2.2.2. Fonctions des macrophages	32
2.3. Les cellules dendritiques (DCs)	35
2.4. Les récepteurs toll-like (TLRs)	37
2.4.1. Description générale et expression tissulaire	37
2.4.2. Fonction des TLRs	40
3. Les lymphocytes, effecteurs de l'immunité	42
3.1. Les lymphocytes Th effecteurs : Th1 et Th2	43
3.2. Les lymphocytes Th17	44
3.2.1. Différenciation des cellules Th17	45
3.2.1.1. Cytokines impliquées	45
3.2.1.2. Facteurs de transcription impliqués	47
3.2.2. Profil cytokinique associé aux cellules Th17	49
3.3. Nouvelles sous-populations de Th	52
3.4. Autres types cellulaires capables de sécréter des cytokines inflammatoires type IL-17, IL-22	53
3.4.1. Les ILCs	54
3.4.2. Les lymphocytes T gamma-delta (LT $\gamma\delta$)	56
3.4.3. Les lymphocytes T invariants natural killer (iNKT)	57
3.5. Pathologies associées à la balance IL-17/Tregs	58
3.6. Les lymphocytes T régulateurs (Tregs)	60
3.6.1. Ontologie et phénotype des sous-populations de Tregs	61
3.6.1.1. Les cellules T régulatrices naturelles (nTregs)	62
3.6.1.2. Les cellules T régulatrices inductibles (iTregs)	65
3.6.1.2.1. Les cellules T régulatrices inductibles CD4 ⁺ : Tr1 et Th3	65
3.6.1.2.2. Les cellules T régulatrices inductibles CD8 ⁺ : iCD8 ⁺ Tregs	67
3.6.1.3. Les cellules T régulatrices mémoires (mTregs)	68
3.6.2. Rôles et différent mode d'action des Tregs	69
C. Les cellules Th1/Th17/Tregs : Acteurs clés de la balance immunitaire régulant l'homéostasie	71
Chapitre 2 : Les mycotoxines	75
A. Généralités sur les mycotoxines	75
1. Contamination par la voie alimentaire	77
2. Contamination par la voie respiratoire	80
B. Les trichothécènes, puissants immuno-modulateurs	84
1. Les trichothécènes de type A	86
1.1. La toxine T-2	86
1.2. Niveau de contamination par la toxine T-2	87
1.3. Exposition à la toxine T-2 et réglementation/recommandation européenne	87

1.4.	Toxicité de la toxine T-2	88
1.4.1.	Toxicité aiguë de la toxine T-2	88
1.4.2.	Toxicité subchronique de la toxine T-2	89
1.4.3.	Effets de la toxine T-2 sur les muqueuses pulmonaires et intestinales	90
1.4.3.1.	Effets sur la muqueuse pulmonaire	90
1.4.3.2.	Effets sur la muqueuse intestinale	90
1.4.4.	Effets hématopoïétiques	91
1.4.5.	Effets sur les cellules immunitaires	92
1.4.5.1.	Effets sur les macrophages et cellules dendritiques	92
1.4.5.2.	Effets sur les cellules lymphocytaires	93
2.	Les trichothécènes de type B	93
2.1.	Le déoxynivalénol (DON)	93
2.1.1.	Distribution et niveau de contamination par le DON	94
2.1.2.	Exposition au DON et réglementation	95
2.1.3.	Toxicité aiguë	97
2.1.4.	Toxicité subchronique	97
2.1.5.	Effet sur les muqueuses pulmonaire et intestinale	98
2.1.5.1.	Effets sur la muqueuse pulmonaire	98
2.1.5.2.	Effets sur la muqueuse intestinale	98
2.1.6.	Effet sur les cellules immunitaires	99
2.1.6.1.	Effets sur les macrophages et cellules dendritiques	99
2.1.6.2.	Effets sur les cellules lymphocytaires	100
Chapitre 3 : Méthodes de décontamination des mycotoxines		101
1.	Les méthodes physiques	101
2.	Les méthodes chimiques	102
3.	Les méthodes d'adsorption et de détoxification biologique	103
3.1.	Les adsorbants	103
3.2.	La détoxification biologique	105
3.3.	Microorganismes et induction de processus biologiques pour contrecarrer les effets des mycotoxines	105
Objectifs de la thèse		109
Travail expérimental		115
ETUDE 1:		117
La toxine T-2 altère l'activation des macrophages alvéolaires induites par les agonistes des TLR conduisant à une diminution de la réponse pro-inflammatoire chez le porc		117
ETUDE 2 :		131
Effet des trichothécènes sur la balance immunitaire intestinale IL-17/Tregs dans le modèle porcin		131
I.	Effet du déoxynivalénol	132
II.	Effets comparés de deux fusariotoxines : le déoxynivalénol (DON) et la toxine T-2 (T-2)	145
ETUDE 3 :		171
Méthode alternative utilisant la souche de bactérie commensale, <i>Lactobacillus sobrius</i> 16698T, pour limiter les effets inflammatoires générés par les trichothécènes : Cas du déoxynivalénol et de la toxine T-2 chez le porc		171
Discussion et perspectives		205
A.	La toxine T-2 favorise la susceptibilité aux maladies infectieuses au niveau respiratoire en altérant les fonctions des cellules présentatrices de l'antigène (CPAs)	207
B.	Les trichothécènes induisent une pro-inflammation associée une induction de l'IL-17 au niveau intestinal	212
Références		223

Liste des figures

Figure 1 : Caractéristiques principales des réponses immunitaires innée et acquise selon McGuinness D.H. et al. (2003).....	17
Figure 2: Structure comparée de l'immunité des muqueuses : (A) le BALT et (B) le GALT	19
Figure 3: Ontogénèse des cellules de l'immunité.....	20
Figure 4: Cellules épithéliales et sécrétions pouvant influencer la réponse immunitaire (Goto and Ivanov, 2013).....	23
Figure 5: Ontogénèse des cellules présentatrices de l'antigène (CPAs).....	29
Figure 6: Principaux changements morphologiques, phénotypiques et fonctionnels au cours de la maturation des cellules dendritiques.....	35
Figure 7: Expression des TLRs en fonction du type cellulaire	37
Figure 8: Structure et localisation des TLRs au sein d'une cellule (Takeda K. et al., 2005)	38
Figure 9: Différentes voies de signalisation induites par l'interaction TLR - TLR-ligand (Kawai and Akira, 2009)	41
Figure 10: Ontogénèse des lymphocytes $T\alpha\beta$	43
Figure 11: Différenciation des lymphocytes Th naïves en Th17 selon le modèle souris (A) ou le modèle humain (B) : Implication de l'environnement cytokinique	46
Figure 12: Différenciation des lymphocytes Th naïves en Th17 : Implication des facteurs de transcription	48
Figure 13: Différenciation des cellules lymphoïdes innées (ILCs) et sécrétions associées (d'après Spits and Di Santa, 2010)	55
Figure 14: Les cellules Th17 et leurs implications dans les réponses immunitaires.....	58
Figure 15: Actions des LT régulateurs face à l'induction des réponses T effectrices	60
Figure 16: Ontologie et phénotype des différentes cellules Tregs.....	62
Figure 17: Mécanismes d'action et cellules cibles des Tregs.....	69
Figure 18: Balance inflammatoire Th17 – Tregs	73
Figure 19: Exposition par voie alimentaire : contamination des denrées par les mycotoxines	78
Figure 20: Exposition par voie respiratoire du personnel agricole.....	81

Figure 21: Exposition par voie respiratoire à travers les logements insalubres.....	83
Figure 22: Structures chimiques des principaux trichothécènes de type A et de type B d'après Meissonier et al. 2008	85
Figure 23 : Démarche expérimentale mise en place pour répondre à l'objectif 1.....	111
Figure 24 : Démarche expérimentale mise en place pour répondre à l'objectif 2.....	113
Figure 25 : Démarche expérimentale mise en place pour répondre à l'objectif 3.....	114
Figure 26 : Schéma général des résultats obtenus au cours de l'étude 1	209
Figure 27 : Schéma général des résultats obtenus au cours de l'étude 2	215
Figure 28: Schéma général des résultats obtenus au cours de l'étude 3	220

Liste des tableaux

Tableau 1: Cytokines produites par les cellules épithéliales et leurs implications dans les réponses immunitaires.....	27
Tableau 2: Comparaison phénotypique entre macrophages et DCs en fonction de leur localisation tissulaire (intestin et poumon) selon les différentes espèces : homme (H), souris (S) et porc (P).....	32
Tableau 3 : Composants microbiens reconnus par les TLRs selon Akira et al. (2006).....	40
Tableau 4: Synthèse de l'ensemble des rôles et des cellules productrices des cytokines affiliées au profil de sécrétion des cellules Th17	52
Tableau 5: Résumé des types cellulaires T producteurs d'IL-17 (d'après Kim et Jordan, 2012)	54
Tableau 6 : Phénotype des différentes sous-populations de Tregs chez l'Homme	64
Tableau 7: Mycotoxines : Structures chimiques et moisissures productrices associées (inspiré du rapport de l'Afssa, 2009)	76
Tableau 8: Niveaux de contamination par le DON relevés entre 1999 et 2002 dans le blé de plusieurs pays européens.....	94
Tableau 9: Teneurs maximales de DON dans les denrées alimentaires destinées à l'alimentaire humaine (A) et animale (B)	96
Tableau 10 : Influence des probiotiques sur l'incidence de diarrhée chez le porcelet (comparaisons entre le groupe témoin et le groupe probiotique.....	218

Abréviations

	Français	Anglais
AhR:	Récepteur d'aryl-hydrocarbone	Aryl-hydrocarbon receptor
ARNm:	Acide ribo-nucléique messenger	messenger ribo-nucleic acid
ATA:	Aleucie toxique alimentaire	Aleucia Toxic Alimentary
BALT:	Tissu lymphoïde associé aux bronches	Bronchus-associated lymphoid tissue
CCL:	Ligand des chémokines aux motifs C-C	C-C pattern Chimiokine ligand
CCR:	Récepteurs de chémokine à motifs C-C	C-C pattern Chimiokine receptor
CD:	Maladie de Crohn	Crohn Disease
cDC :	Cellules dendritiques conventionnelles	conventional Dendritic Cells
CPA(s):	Cellule(s) présentatrice(s) de l'antigène	Antigen-presenting Cells
CTL:	Lymphocyte T cytotoxique	Cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4:	Antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques	Cytotoxic T lymphocyte antigen4
CXCL:	Ligand des chémokines aux motifs C-X-C	C-X-C pattern chimiokine ligand
CXCR:	Récepteurs de chémokine à motifs C-X-C	C-X-C pattern chimiokine receptor
DC(s):	Cellule(s) dendritique(s)	Dendritic cells
DON:	Déoxynivalénol	Deoxynivalenol
EAE:	Encéphalopathie Auto-immune Expérimentale	Encéphalopathy Auto-immune Experimentalis
FoxP3:	Forkhead-box protein 3	Forkhead-box protein 3
GALT:	Tissu lymphoïde associé à l'intestin	Gut-associated lymphoid tissue
GATA-3:	GATA binding protein 3	GATA binding protein 3
GM-CSF:	Facteur stimulant les colonies de Granulocyte-Macrophages	G-M Colony Stimulating Factor
IBD:	Maladies inflammatoires de l'intestin	Inflammatory bowel diseases
Id2:	Inhibiteur du site de liaison à l'ADN-2	Inhibitor of DNA binding-2
IFN-:	Interféron-	Interferon-
Ig-:	Immunoglobuline-	Immunoglobulin-
IL-:	Interleukine-	Interleukin-
IL-17R:	Récepteur à l'interleukine 17	Interleukin-17 receptor
ILC(s):	Cellule(s) lymphoïde(s) innée(s)	Innate lymphoid cell(s)
IPEX:	Immuno-dérégulation Poly-endocrinopathie Entéropathie auto-immune liée au chromosome X	Immune-Dysregulation Poly-endocrinopathy auto-immune X-linked
IRF:	Facteur régulateur d'interféron	Interferon regulatory factor
iTreg(s):	Cellule(s) T régulatrice(s) induite(s)	Induced-T regulatory cell(s)
KO:	Knock-out	Knock-out
LAG-3:	Gène d'activation lymphocytaire 3	Lymphocyte-activation gene 3
LRR:	Région riche en leucine	Leucin rich region ou
LT:	Lymphocyte T	T lymphocyte
MALT:	Tissu lymphoïde associé aux muqueuses	Mucosa-associated lymphoid tissue
MAPK:	Mitogens-associated proteins kinase	Mitogens-associated proteins kinase

Résumé

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires des moisissures qui peuvent naturellement contaminer de nombreux supports (céréales, fruits, papiers peints, compost). Dans ces travaux de thèse, nous avons focalisé notre intérêt sur deux mycotoxines produites principalement par les champignons du genre *Fusarium*, appartenant toutes deux au même groupe des trichothécènes, **le déoxynivalénol (DON)** et **la toxine T-2 (T-2)**. Les objectifs de cette thèse ont été de déterminer les effets de ces deux toxines sur la mise en place des réponses immunitaires au sein de **la muqueuse respiratoire et intestinale**. L'ensemble de ces études a été réalisé chez le porc, espèce cible de ces contaminants et animal modèle pour l'Homme. Les résultats de ces travaux ont montré que ces deux toxines affectent la **réponse immunitaire**.

Au niveau du tractus respiratoire, une faible dose de toxine T-2 altère l'activation des **macrophages alvéolaires** lorsqu'ils sont stimulés par les agonistes des TLRs -4, -2/6 (lipopolysaccharides et acides lipoteichoïques, respectivement) en diminuant la synthèse du composé antimicrobien NO et des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α . Cette immunosuppression pourrait alors conduire à une susceptibilité plus accrue des porcs à des infections opportunistes.

Au niveau du tractus intestinal, à l'état basal, nous avons mis en évidence que le DON comme la toxine T-2 induit une forte réponse inflammatoire innée associée à la stimulation de la voie IL-17 en inhibant le développement des cellules T régulatrices. Des études mécanistiques ont permis de déterminer que les cytokines associées à la voie IL-17 suite à une exposition aux trichothécènes, sont produites par une des sous-populations de cellules T innées, les **cellules T $\gamma\delta$ productrices d'IL-17**.

La troisième partie de ce travail a porté sur l'utilisation de la souche ***Lactobacillus sobrius* DSM 16698T** dans le but de lutter contre les effets immunomodulateurs générés lors d'une exposition aux trichothécènes. Les résultats de ce travail ont montré que cette souche bactérienne est capable de réduire les effets inflammatoires IL-17 et de rétablir les paramètres impliqués dans les fonctions de la barrière intestinale, suite à une exposition *ex vivo* et *in vivo* au DON. En revanche, cette souche a peu d'effet contre la toxine T-2.

L'ensemble de ce travail de thèse suggère donc qu'une exposition à de faibles doses de trichothécènes pourrait accroître la susceptibilité des animaux aux perturbations de nature infectieuse ou inflammatoire.

Mot-clés : Déoxynivalénol, Toxine T-2, muqueuses respiratoire et intestinale, réponses immunitaires, homéostasie, balance IL-17/Tregs, bactérie commensale, porc, maladies inflammatoires intestinales.

Abstract

Mycotoxins are fungi secondary metabolites that can contaminate a lot of environments worldwide such as cereals, fruits, wallpapers, and compost heaps. Throughout this PhD work, we focused on two mycotoxins mainly produced by *Fusarium* species, both belonging to the trichothecenes group: the **deoxynivalenol (DON)** and the **T-2 toxin (T-2)**. The aims of this study were to determine the effects of these two toxins on the immune response implementation in **respiratory and intestinal mucosa**. Studies were performed on swine being a target species of these contaminants and a model species for Humans. The results of these works proved that these two mycotoxins can affect **the immune response**.

In the respiratory tract, a low dose of T-2 toxin alters the activation of the alveolar macrophages when they are stimulated by the agonists of TLRs -4 and -2/6 (lipopolysaccharides and lipoteichoic acids, respectively). This alteration is due to the decrease of the synthesis of the anti-microbial compound NO and the pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α . This immunosuppression can induce the emergence of opportunist infections in pig.

In the intestinal tract, in background level, we demonstrated that DON as well as T-2 toxin induces a strong inflammatory immune response associated with stimulation of IL-17 pathway by inhibiting of the development of regulatory T cells. Mechanistic studies were used to determine the production origin of the cytokine associated to the IL-17 pathway. This cytokine is produced by one of the subpopulations of Tregs, the **Ty δ cells IL-17 producing** when exposed to trichothecenes.

The third part of this work was about the use of *Lactobacillus sobrius* DSM 16698T strain to counteract the immunomodulatory effects induced after trichothecene exposure. The results of this study showed that this bacterial strain is able to reduce IL-17 inflammatory effect and is also able to re-establish the parameters involved in the intestinal barrier functions in *ex vivo* and *in vivo* response to DON. Nevertheless, this strain is less effective against the T-2 toxin.

Taken together, results of this PhD suggest that an exposure to low doses of trichothecenes could be intensify the susceptibility of animal to infectious or inflammatory disease.

Key-words: Deoxynivalenol, T-2 toxin, respiratory and intestinal mucosa, immune responses, homeostasis, IL-17/Tregs balance, commensal bacteria, pig, intestinal bowel disease.

Listes des publications et des communications

Publications scientifiques acceptées:

- 2013: **Deoxynivalenol as a New Factor in the Persistence of Intestinal Inflammatory Diseases: An Emerging Hypothesis through Possible Modulation of Th17-Mediated Response.** Seeboth J*, Cano PM*, Meurens F, Cognie J, Abrami R, Oswald IP, Guzylack-Piriou L. PLoS One. 2013;8(1):e53647. doi: 10.1371/journal.pone.0053647. Epub 2013 Jan 10. *These authors contributed equally to this work.
- 2012: **The fungal T-2 toxin alters the activation of primary macrophages induced by TLR-agonists resulting in a decrease of the inflammatory response in the pig.** Seeboth J, Solinhac R, Oswald IP, Guzylack-Piriou L. Vet Res. 2012 Apr 24;43(1):35. doi: 10.1186/1297-9716-43-35.

Publications scientifiques en cours de préparation:

Effect of *Lactobacillus sobrius* 16698T on the inflammatory responses and the intestinal barrier effects-induced by deoxynivalenol. Seeboth J, Menard S, Oswald IP and Guzylack-Piriou L. (en préparation).

The mechanistic and phenotypic characterization of main immune actors in modulation of intestinal immune responses induced by two mycotoxins. Seeboth J, Gauthier T, Oswald IP and Guzylack-Piriou L. Immunobiology (en préparation).

Communications orales:

- 2013: Journée Mycotoxines 2013 à Brest, France: **Exposition intestinale au DON et à la toxine T-2 : Effet protecteur des *Lactobacillus sobrius*.** Julie Seeboth, Isabelle P. Oswald, Laurence Guzylack-Piriou. INRA, ToxAlim, équipe d'immuno-mycotoxicologie, 180 Chemin de Tournefeuille, Toulouse, France.
- 2012: Rencontre entre les différents partenaires d'un projet européen : INTERPLAY à Helsinki, Finlande. **Contribution of *Lactobacillus sobrius* 16698 in the maintaining of intestinal homeostasis in response to ETEC infection in piglets.** Julie Seeboth, Isabelle Oswald, Laurence Guzylack-Piriou. INRA, ToxAlim, Immuno-mycotoxicology team, 180 Chemin de Tournefeuille, Toulouse, France in collaboration with INRAN- Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione, Rome, Italy
- 2011: Les 8^{èmes} journées du réseau francophone d'Immunologie des animaux domestiques à Lyon, France: **Decrease of the pro-inflammatory response in porcine alveolar macrophages (PAM) by the T-2 toxin.** Julie Seeboth, Romain Solinhac, Isabelle P. Oswald, Laurence Guzylack-Piriou. INRA, Laboratoire de Pharmacologie Toxicologie, 180 chemin de Tournefeuille, B.P.3, 31931 Toulouse Cedex 9. France

Communications affichées:

- 2011: Journée de l'école doctorale SEVAB à Toulouse, France (Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques, et Bioingénieries) : **La mycotoxine déoxynivalénol (DON) oriente la réponse immunitaire intestinale vers une réponse inflammatoire Th1/Th17 et inhibe les effets bénéfiques de *Lactobacillus amylovorus*.** Julie Seeboth, Patricia Cano, Roberta Abrami, Isabelle P. Oswald et Laurence Guzylack-Piriou. INRA, ToxAlim, équipe d'immuno-mycotoxicologie, 180 Chemin de Tournefeuille, Toulouse, France. **Récompensée du deuxième prix « communication écrite ».**
- 2011: Journées du département de santé animale à Fréjus, France : **Low doses of T-2 toxin induce a decrease of the pro-inflammatory immune response in porcine alveolar macrophages in response to microbial patterns.** Julie Seeboth, Romain Solinhac, Isabelle P. Oswald, Laurence Guzylack-Piriou. INRA, Laboratoire de Pharmacologie Toxicologie, 180 chemin de Tournefeuille, B.P.3, 31931 Toulouse Cedex 9. France
- 2010: Société Française d'Immunologie à Marseille, France: **The fungal T-2 toxin alters the TLR activation of the porcine alveolar macrophages (PAMs) resulting in a decrease of the inflammatory response.** Julie Seeboth, Romain Solinhac, Isabelle P. Oswald, Laurence Guzylack-Piriou. INRA, Laboratoire de Pharmacologie Toxicologie, 180 chemin de Tournefeuille, B.P.3, 31931 Toulouse Cedex 9. France

INTRODUCTION

Contexte de l'étude

La santé publique, la qualité et la sécurité sanitaire des aliments sont des préoccupations majeures au niveau mondial, et notamment en France. Les mycotoxines, sont des produits du métabolisme secondaire des champignons et sont distribuées de façon ubiquitaire. Leur présence peut être à l'origine d'intoxication par voie digestive et aérienne. L'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) estime que 25% des récoltes mondiales sont contaminées par ces toxines (CAST, 2003). En France, les conditions d'humidité et de température sont propices au développement des champignons du genre *Fusarium* aussi bien au champ, sur les céréales (blé, maïs, orge) que dans les logements humides et mal ventilés (papiers peints, climatisation). Ces différents environnements sont alors susceptibles d'être contaminés par les principales mycotoxines produites par ces champignons, à savoir le déoxynivalénol (DON), fusariotoxine la plus fréquemment retrouvée en France ou la toxine T-2, mycotoxine la plus toxique du groupe des trichothécènes. Il s'avère donc nécessaire de s'interroger sur les risques associés à leur présence. De nombreux effets toxiques sont liés à la présence de ces mycotoxines allant des effets cancérogènes, tératogènes aux actions immuno-modulatrices (AFSSA, 2009). Ces toxines sont majoritairement considérées comme des contaminants alimentaires mais elles peuvent également être à l'origine de la contamination des voies respiratoires initiant ainsi des effets toxiques indésirables sur la santé humaine et/ou animale. En effet, l'inhalation de spores fongiques et d'éléments mycéliens contenant des mycotoxines émis en quantité dans l'air entraîne des pathologies respiratoires et cutanées telles que, l'inflammation non spécifique des voies respiratoires, des dermatites, de l'asthme ou encore des mycoses broncho-pulmonaires allergiques. D'après l'Institut Scientifique de la Santé Publique (ISSP) à Bruxelles, la prévalence des allergies liées à la présence de moisissures atteint aux USA près de 20 à 30 % des sujets atopiques soit près de 6% de la population totale.

L'hypothèse de ces travaux est de savoir si des mycotoxines telles que le DON ou la toxine T-2 peuvent altérer l'immunité des muqueuses (respiratoire ou intestinale) en affectant les capacités fonctionnelles des cellules impliquées dans les mécanismes de défense de l'hôte, les prédisposant ainsi de manière plus aigüe au développement de pathologies infectieuses (Li et al., 2007; Oswald and Comera, 1998; Vandenbroucke et al.,

2009). Ce projet a donc eu pour objectif d'étudier les effets du DON et de la toxine T-2 sur les cellules immuno-compétentes (macrophages, cellules dendritiques, cellules épithéliales et cellules T) présentes au niveau des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses ou MALT (mucosa-associated lymphoid tissue).

Avant d'exposer les résultats et les conclusions obtenus à l'issue de ce travail de thèse, un rappel sera tout d'abord effectué sur les principaux acteurs immunitaires et les mécanismes participant au maintien de l'homéostasie au sein des muqueuses de la sphère respiratoire et digestive. Par la suite, ce travail bibliographique traitera des particularités des deux mycotoxines d'intérêts et de leurs actions sur le système immunitaire, suivi par un bref résumé des moyens de lutte actuellement disponibles pour diminuer la prévalence et les effets toxiques de ces mycotoxines.

Rappels bibliographiques

Chapitre 1 : Les réponses immunitaires des muqueuses

A. Maintien de l'homéostasie au sein des muqueuses

L'état d'homéostasie immunitaire réside en une délicate balance permettant le maintien à bas bruit des **réponses immunitaires innées et acquises** lors d'agressions par les agents pathogènes ou commensaux, les xénobiotiques. La réponse immunitaire dite innée est un mécanisme de défense non spécifique contre les pathogènes caractérisés par une action rapide et immédiate. A l'inverse, la réponse acquise se caractérise par une réponse spécifique contre un agent reconnu comme étranger pour l'organisme (non-soi). Cette réponse est plus efficace pour l'élimination des pathogènes du fait de sa spécificité antigénique, mais nécessite un délai plus long pour se mettre en place (McGuinness et al., 2003) (figure 1) .

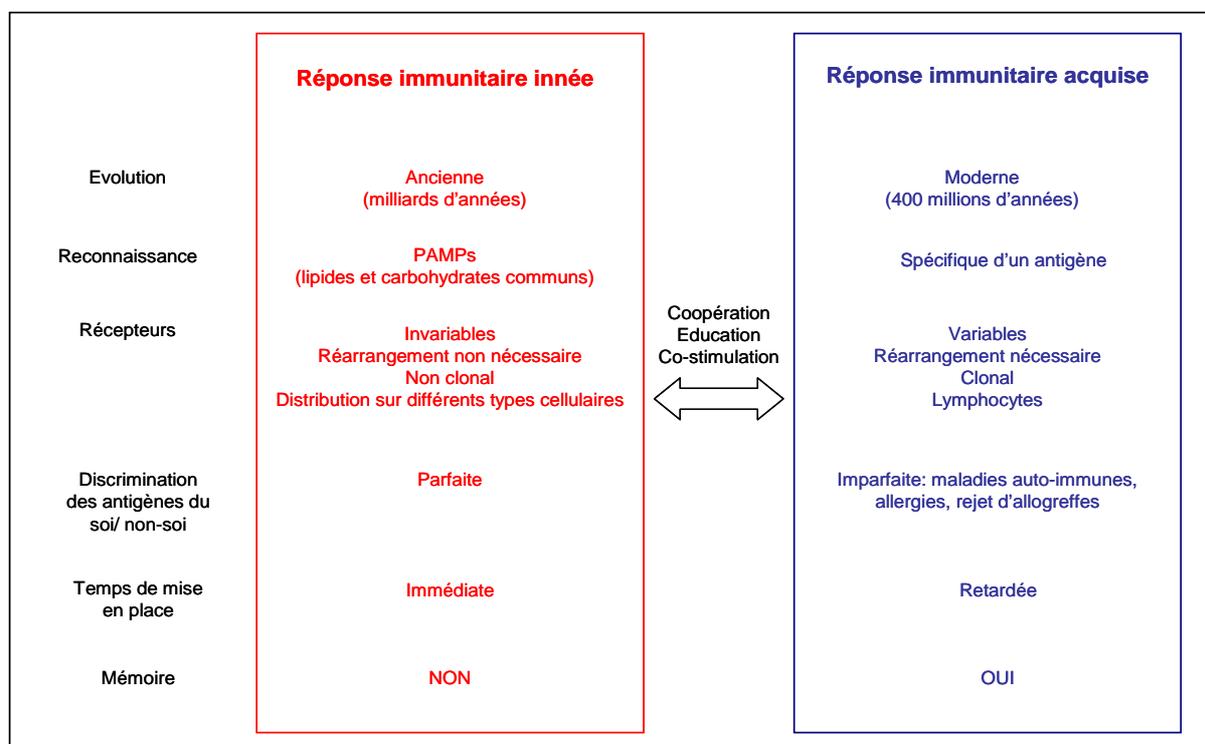


Figure 1 : Caractéristiques principales des réponses immunitaires innée et acquise selon McGuinness D.H. et al. (2003)

Parmi les cellules de la réponse innée, on peut répertorier les polynucléaires (éosinophiles, basophiles, neutrophiles, mastocytes), les cellules natural killer (NK), les cellules lymphoïdes innées (ILCs), les monocytes/macrophages ainsi qu'une sous-population de cellules dendritiques (DCs) appelées DCs plasmacytoïdes (pDCs). Les macrophages et les pDCs sont acteurs de la réponse immunitaire innée mais interviennent également dans la réponse immunitaire acquise via leur capacité à présenter les antigènes aux lymphocytes T. Le maintien d'un équilibre entre les réponses immunologiques innée et acquise est essentiel pour l'organisme. Face à une agression ou un changement physiologique, cet équilibre permet de contrôler les réponses immunitaires qui peuvent parfois devenir excessives et déclencher un état pathologique. On appelle cette relative stabilité, **l'homéostasie immunitaire**. De nombreux tissus, dont les muqueuses, sont soumis à ce contrôle homéostatique. Les muqueuses sont les premières structures au contact de l'environnement extérieur et sont les premières cibles de toutes les perturbations. Elles doivent non seulement assurer la défense de l'organisme face à différents types de pathogènes (champignons, bactéries, virus) ou xénobiotiques (pesticides, mycotoxines...) mais ont également pour rôle de maintenir une tolérance vis-à-vis de la flore commensale. Le concept de système immunitaire commun à toutes les muqueuses (CMIS Common Mucosal Immune System) a été proposé dans les années 1970 du fait de leurs structures anatomiques communes, leurs effecteurs identiques (notamment les IgA sécrétoires) et de la migration des cellules entre les différents compartiments. A la fin du XX^e siècle, une nouvelle nomenclature a été adoptée, désignant ce système immunitaire par l'acronyme **MALT** : muqueuses associées aux tissus lymphoïdes (Mucosa-associated lymphoid tissue). Il se décompose en Bronchus-associated lymphoid tissue (**BALT**) (Holt et al., 2008) pour le tissu associé à la voie respiratoire et en Gut-associated lymphoid tissue (**GALT**) (Fagarasan and Honjo, 2003) pour les structures associées à l'intestin (Figure 2).

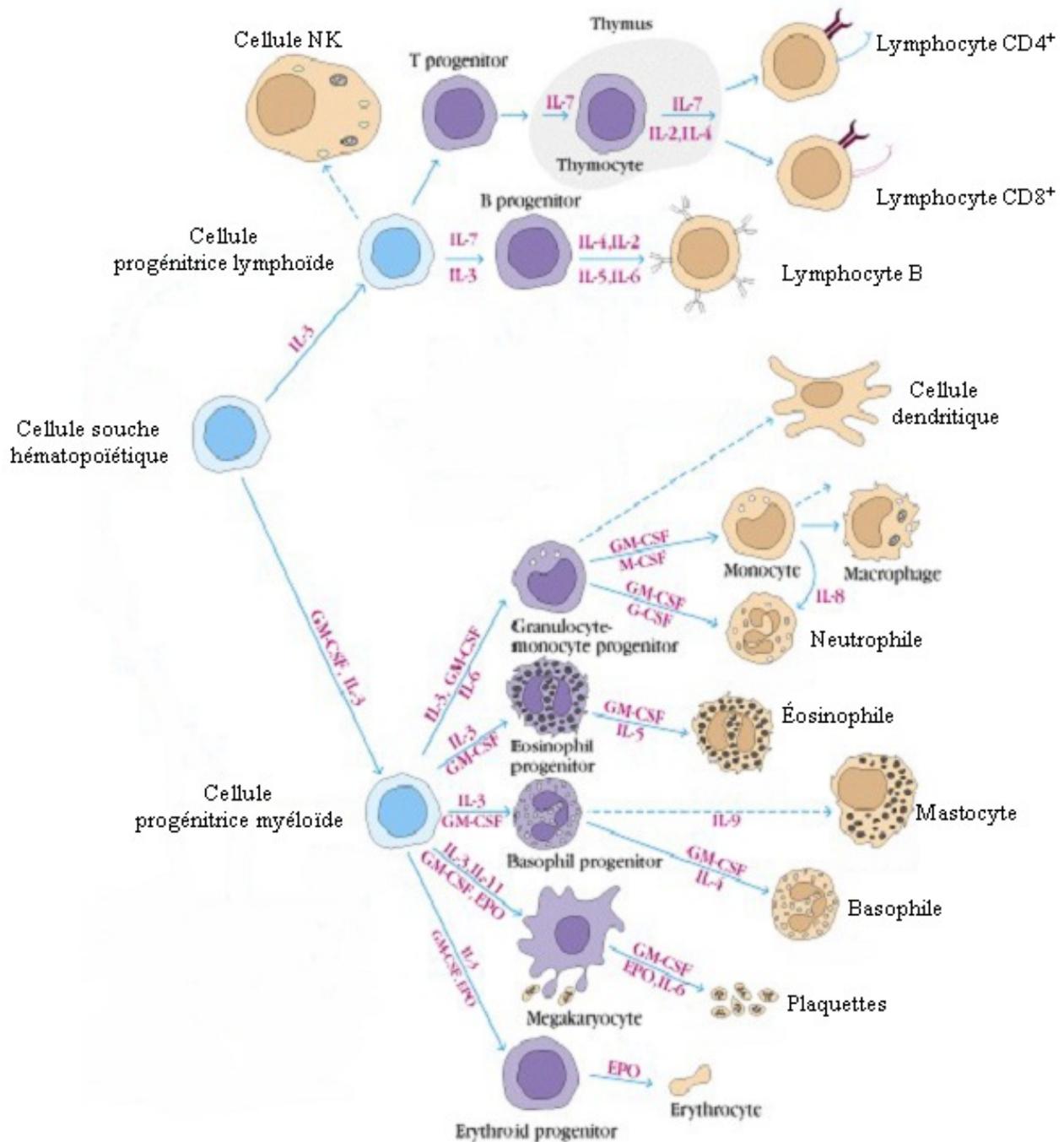


Figure 3: Ontogénèse des cellules de l'immunité

Plus récemment, un rôle dans l'immunité a été attribué à des cellules immuno-compétentes moins connues appelées cellules « barrières » (ou échanges) dans l'organisme. Elles sont présentes à la surface des muqueuses et en contact direct avec l'environnement. Parmi elles, on compte **les cellules épithéliales** (Peaudecarf and Rocha, 2010).

B. Les acteurs immunitaires présents dans les tissus associés aux muqueuses

1. Les cellules épithéliales

Les cellules épithéliales constituent la première barrière physique contre les micro-organismes pathogènes et/ou xénobiotiques. Différents mécanismes sont mis en œuvre pour lutter contre ces agressions. Les jonctions serrées intracellulaires empêchent la diffusion de pathogènes ou de molécules au travers de l'épithélium (Van Itallie and Anderson, 2006). La couche de mucus, produite par les cellules caliciformes (cellules de Goblet) protège la surface de l'épithélium en séquestrant des peptides anti-microbiens, des molécules cytoprotectives et des IgA sécrétoires. Enfin, la sécrétion de différents facteurs tels que les cytokines et les chémokines (Goto and Ivanov, 2013) permet de recruter les cellules immunitaires assurant ainsi la capture et l'élimination des éléments étrangers. L'ensemble de ces fonctions explique leur rôle central dans l'initiation et la régulation de la réponse immunitaire innée et adaptative au sein des muqueuses.

Les cellules épithéliales agissent sur différentes fonctions immunitaires à travers leurs sécrétions. Leur capacité à sécréter des molécules inflammatoires comme les interleukines (IL-) telles que **l'IL-8**, **l'IL-1 alpha/beta** (IL-1 α / β), **l'IL-6** ou encore le **TNF- α (tumor necrosis factor alpha)** leur permet d'attirer sur le site infectieux les partenaires cellulaires de l'immunité en cas d'intrusion.

La sécrétion d'**IL-8 (ou CXCL8)** par les cellules épithéliales a été montré *in vitro* grâce à de nombreux modèles cellulaires humains utilisant des cellules issues de lignées épithéliales alvéolaires (A549) ou intestinales (Caco2) (Kaza et al., 2010; Schuerer-Maly et al., 1994) mais également chez d'autres espèces, comme le porc avec l'utilisation de lignées alvéolaires (NPT_r) ou intestinales (IPEC-1) (Auger et al., 2009; Oswald, 2006). *In vivo*, l'IL-8 est une cytokine chémo-attractante pouvant influencer la capacité de migration des neutrophiles au niveau des organes enflammés (Pieper et al., 2013). Son rôle a été décrit *in vitro* dans le chémotactisme des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ provenant des lymphocytes T circulants (Proud and Leigh, 2011). La famille de cytokine **IL-1 comprend** l'IL-1 α et l'IL-1 β . L'IL-1 est impliquée dans l'inflammation locale. Elle est produite par les cellules épithéliales mais également par de nombreux types cellulaires incluant les cellules T, les éosinophiles (Krzyszicki et al., 1997), les DCs (Ghanekar et al., 1996) et les macrophages (Brody and Durum,

1989). *In vitro*, IL-1 α stimule les macrophages mais induit également la prolifération des cellules CD4⁺, la production d'IL-2, la prolifération des cellules B matures et la sécrétion d'immunoglobulines (Ig). Le **TNF- α** a des fonctions très similaires à l'IL-1. Il existe également deux types de TNFs : le TNF- α et le TNF- β produit par les macrophages et les cellules T activées respectivement. Le TNF- α est impliqué dans de nombreux processus biologiques tels que l'activation et la croissance cellulaire mais intervient également dans la régulation de l'apoptose. Les effets immédiats des cytokines IL-1 et TNF sont d'augmenter l'expression des molécules d'adhésion des cellules endothéliales et de stimuler la production de chémokines telles que l'IL-8 et l'IL-6 par les tissus (Feldmann and Saklatvala, 2004). L'**IL-6** est nécessaire en présence d'IL-1 et de TNF au recrutement des polynucléaires, macrophages et DCs sur les sites enflammés, induisant une production autocrine. L'IL-6 est également connu pour être un facteur majeur dans la différenciation des lymphocytes B et active ces derniers afin de produire des Ig. L'IL-6 agit également sur les lymphocytes T en augmentant l'expression du récepteur à l'IL-2 (CD25), facteur de survie de ces cellules (Kishimoto et al., 1992).

Les cellules épithéliales ne sécrètent pas seulement des cytokines pro-inflammatoires. En effet, elles interviennent dans le recrutement, la maturation et les fonctions des lymphocytes intra-épithéliaux majoritairement CD8⁺ (IELs) (Figure 4A), dans l'induction de la réponse IgA (Figure 4B), la régulation de l'homéostasie des cellules lymphoïdes innées (Figure 4C) et peuvent moduler la différenciation des cellules T (Figure 4D) (Goto and Ivanov, 2013; Kolls and Linden, 2004) (Figure 4).

Les cellules épithéliales sont distribuées sous forme de monocouche cellulaire et sont localisées à proximité des IELs leur permettant d'interagir ensemble. Cette interaction favorise la maturation des IELs et l'acquisition d'une activité cytotoxique aidant à éliminer les cellules épithéliales infectées ou endommagées (Goto and Ivanov, 2013) (Figure 4A).

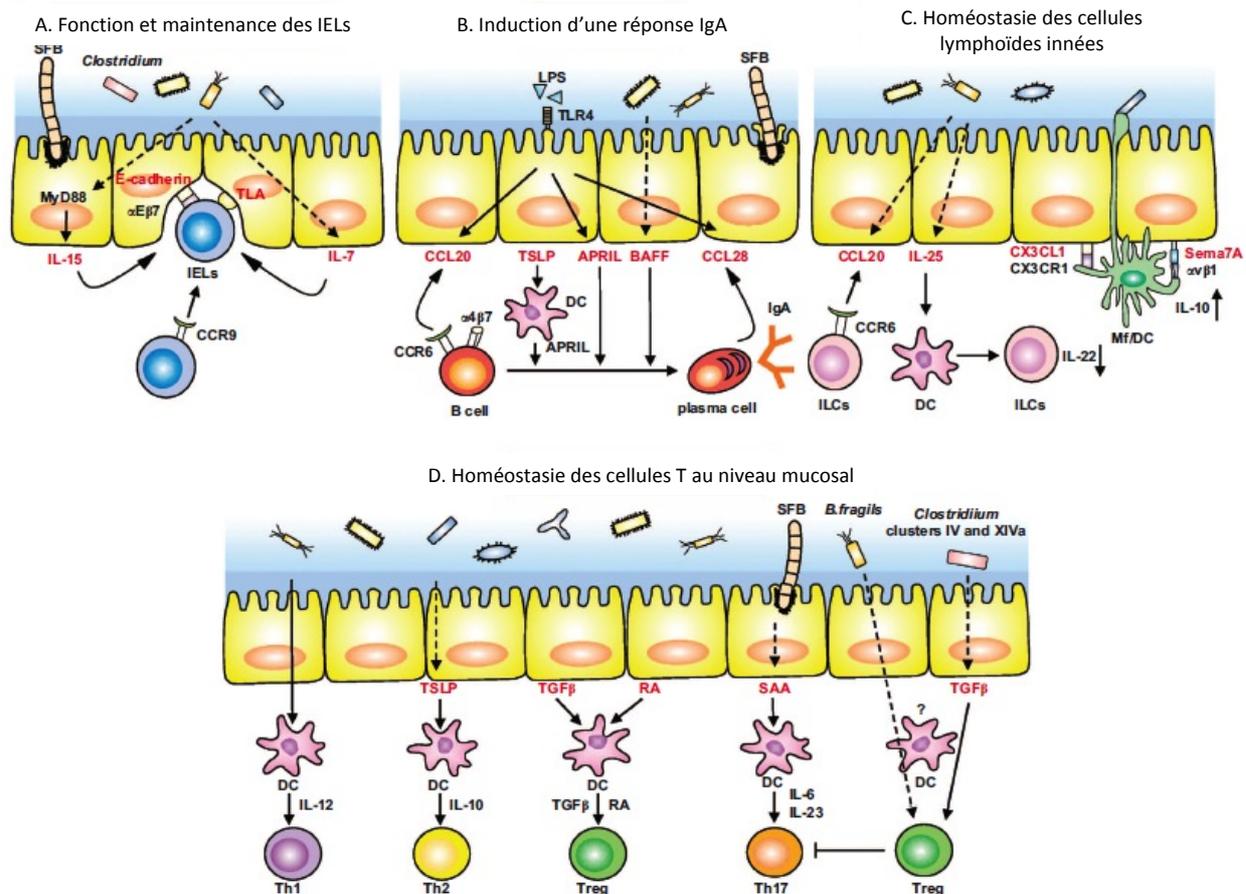


Figure 4: Cellules épithéliales et sécrétions pouvant influencer la réponse immunitaire (Goto and Ivanov, 2013)

Les cellules épithéliales sont également impliquées dans l'induction de la réponse en IgA (figure 4B). A travers la sécrétion de diverses chémokines de type CC telles que **CCL20** (MIP-3 α) et **CCL28**, elles permettent respectivement le recrutement des cellules B et des cellules plasmacytoïdes. CCL20 est une chémokine majoritairement produite en réponse à des stimuli pro-inflammatoires (IL-1 α/β , TNF- α ...) (Reibman et al., 2003). Elle se lie au récepteur CCR6 localisé sur les lymphocytes B, macrophages, DCs et ILCs permettant leur recrutement et une initiation efficace des réponses immunitaires (McDonald et al., 2007; Sonnenberg et al., 2011). Cette chémokine est également produite par les lymphocytes Th17 humains (Wilson et al., 2007). Les cellules épithéliales induisent aussi la production de **BAFF** (B-cells activating factor) et **APRIL** (A proliferation-inducing ligand). BAFF et APRIL sont des cytokines appartenant toutes les deux à la famille des ligands du TNF (Moore et al., 1999; Ng et al., 2005). BAFF est également appelé lymphocyte B stimulator (BLyS). Sa fonction principale est

d'intervenir dans les processus de prolifération, de différenciation, de maturation et de survie des lymphocytes B (Batten et al., 2000; Schneider et al., 1999; Sutherland et al., 2006). APRIL a des fonctions similaires (Mackay and Ambrose, 2003). Des souris déficientes pour APRIL montrent un niveau basal en IgA diminué dans le sérum et un nombre de cellules T effectrices augmenté (Castigli et al., 2004). APRIL joue un rôle dans la permutation de classe des Ig en IgA (Litinskiy et al., 2002). Une production excessive de BAFF peut être à l'origine de l'induction de maladie auto-immune chez la souris (Khare et al., 2000; Mackay et al., 1999). Les cytokines BAFF et APRIL sont sécrétées par de nombreux types cellulaires incluant les cellules épithéliales mais également les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques ainsi que les cellules B et T (Ng et al., 2005). De plus, en réponse aux cytokines pro-inflammatoires, de nombreuses cellules immunitaires augmentent l'expression de BAFF et APRIL dans le but de faciliter les réponses induites par les cellules B et T. C'est pourquoi BAFF et APRIL peuvent jouer un lien crucial entre les réponses immunitaires innées et adaptatives. **TSLP** (thymic stromal lymphopoetin) est une cytokine également produite par les cellules épithéliales. Elle est exprimée au niveau pulmonaire mais également de façon constitutive au niveau de l'intestin. Au niveau pulmonaire, l'expression de TSLP est augmentée chez les sujets asthmatiques et corrélée avec les symptômes d'asthme sévère (Ying et al., 2005). En effet, TSLP joue un rôle dans la sensibilisation des voies respiratoires aux allergènes et permet aux DCs d'initier la différenciation des cellules T naïves en Th2 (Huston and Liu, 2006). TSLP est donc impliquée dans le maintien d'une réponse contrôlée des cellules immunitaires. Au niveau intestinal, Saenz et ses collègues (2008) montrent que l'expression de TSLP induit la capacité des DCs à inhiber la sécrétion d'IL-12, le développement des lymphocytes T régulateurs (Tregs) et favorise la mise en place d'une réponse Th2 (Saenz et al., 2008; Ziegler and Artis, 2010). De plus, il a été montré que la présence de TSLP augmentait l'expression de FoxP3, marqueur spécifique des cellules Tregs. La présence de ce facteur sur des cultures de thymocytes favoriserait leur différenciation en cellules de phénotype CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ caractéristique des Tregs (Jiang et al., 2006; Lee et al., 2008). Cependant, TSLP, bien qu'elle soit non essentielle au développement des Tregs semblerait être aussi une cytokine importante pour limiter la production de cytokines pro-inflammatoires (Rimoldi et al., 2005). TSLP agit également sur les DCs de la *lamina propria* afin qu'elles induisent la sécrétion d'APRIL. Ainsi la combinaison de l'ensemble de ces cytokines permet l'initiation de la réponse en IgA (Figure 4B). **CX3CL1** ou fractalkine

appartient à une autre famille de chémokine : CX3C. Il est important de noter que cette chémokine est indispensable au recrutement des lymphocytes T, NKT et monocytes/macrophages qui expriment à leur surface leur récepteur CX3CR1. Au niveau pulmonaire, Rimaniol et al. (2003) observent une expression sur les cellules épithéliales de CX3CL1 largement augmentée après un épisode asthmatique (Rimaniol et al., 2003). De plus, le niveau d'expression de cette chémokine mesuré dans les lavages broncho-alvéolaires de ces patients montre une corrélation positive entre les maladies inflammatoires et la fréquence des cellules mononucléées (Fujimoto et al., 2001). Au niveau intestinal, Nicoletti et al. (2010) montrent que CX3CR1 permet la migration trans-épithéliale des DCs (Nicoletti et al., 2010). Les DCs et les macrophages CX3CR1+ de la *lamina propria* ont la capacité d'allonger leurs dendrites entre les cellules épithéliales pour capter les éléments présents dans la lumière intestinale (Farache et al., 2013). Cette interaction CX3CR1-CX3CL1 induit la production de cytokines anti-inflammatoires tel que l'IL-10 et supprime la réponse inflammatoire (Goto and Ivanov, 2013) (Figure 4C).

Enfin, les cellules épithéliales interviennent dans un dernier mécanisme essentiel : le maintien de l'homéostasie mucoale grâce à leur rôle sur les cellules T. Elles peuvent, en effet, moduler la différenciation des lymphocytes T naïfs en différents types de lymphocytes : les lymphocytes T helper (Th) de type 1 ou **Th1**, **Th2**, **Th17** ainsi que les lymphocytes **T régulateurs** (Tregs). En effet, les cellules épithéliales ont la capacité de sécréter des facteurs informant les DCs de l'intrusion d'un danger, qui à leur tour vont développer une réponse immunitaire adéquate, en induisant la différenciation des cellules T naïfs en lymphocytes Th au sein des tissus lymphoïdes. Ainsi, la voie Th1 est médiée par la sécrétion d'IL-12 produite par les DCs matures, alors que les cellules épithéliales à travers leur sécrétion de TSLP augmentent la sécrétion d'IL-10 par les DCs conduisant à l'induction de la voie Th2. Les cellules épithéliales ont également la capacité de produire de l'IL-6 et de l'IL-23 et ainsi de favoriser la différenciation des cellules T naïves en Th17. Les épithélia qu'ils soient alvéolaires ou intestinaux sont des sources majeures de facteurs de croissance et produisent le transforming growth factor-beta ou **TGF-β**. Celui-ci est impliqué dans des processus physiologiques essentiels comme le développement embryonnaire, la réparation tissulaire, la différenciation et le contrôle de la croissance cellulaire (Roberts, 1998). Ce facteur joue également un rôle important dans le maintien des fonctions immunitaires. En effet, les souris mutées pour un des isotypes du TGF-β meurent de nécrose tissulaire et

d'une réponse inflammatoire généralisée, quelques semaines après la naissance (Roberts, 1998). Dans ce contexte, le TGF- β a non seulement une action anti-proliférative sur les lymphocytes T et les thymocytes mais il contrôle aussi leur différenciation et leur activation. Par conséquent, la différenciation des cellules T naïves en cellules Th17 ou Tregs nécessite la présence de cette cytokine, facteur clé de la régulation de la balance inflammatoire au niveau des muqueuses. De plus, les épithéliums muqueux ont la particularité de sécréter de **l'acide rétinoïque (RA)**. En effet, les cellules épithéliales intestinales ou pulmonaires comme d'autres types cellulaires tels que les hépatocytes, les spermatozoïdes et les cellules immunitaires (DCs et macrophages) expriment des enzymes telles que les **rétinaldéhydes déshydrogénases 1 et 2** (RALDH-1 et 2) capables de convertir la vitamine A en acide rétinoïque (RA) (Zhai et al., 2001). Au niveau intestinal par exemple, l'acide rétinoïque (RA) joue un rôle majeur dans l'expression des récepteurs de domiciliation (intégrines) telles que $\alpha\beta7$ et CCR9 sur les lymphocytes B et T. Le RA est également connu pour être un facteur favorisant le développement des Tregs. A l'inverse, le RA a la capacité d'inhiber le développement des cellules Th17 en présence d'IL-6 et de TGF- β . De plus, le RA peut indirectement augmenter l'induction de FoxP3 induite par le TGF- β à travers une régulation directe du récepteur à l'IL-2. Le RA a la capacité de diminuer l'expression du **retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) γ t**, facteur de transcription déterminant dans le développement des cellules Th17 et induit l'expression de **FoxP3** (Forkhead-box protein 3), facteur de transcription impliqué dans le développement des cellules Tregs (figure 4D) (Goto and Ivanov, 2013).

A l'heure actuelle, de nombreux modèles de cellules épithéliales issues aussi bien des muqueuses respiratoires qu'intestinales, chez l'homme comme chez les animaux, sont utilisés comme modèle *in vitro* pour comprendre l'implication de ce type cellulaire dans les diverses fonctions biologiques décrites ci-dessus. Parmi elles, des lignées de cellules épithéliales alvéolaires ou intestinales d'origine humaine respectivement A549 et Caco2 ou d'origine murine telles que les cellules épithéliales alvéolaires (MLE12) ou intestinales (MODE-K et IEC4) ont été développées. Il existe également des modèles de cellules épithéliales disponibles chez le porc. L'utilisation de cellules épithéliales alvéolaires primaires de porc ou des lignées de cellules épithéliales intestinales d'origine porcine telles que **la lignée IPEC-1** ou IPEC-J2 sont largement décrites. L'utilisation de ces lignées permet de mieux comprendre les effets des toxiques sur la barrière épithéliale et le rôle des cellules

épithéliales sur l’initiation d’une réponse immunitaire (Gonzalez-Vallina et al., 1996; Pinton et al., 2010; Pinton et al., 2009).

Au cours de ce travail de thèse, les effets d’une exposition à deux mycotoxines, DON et toxine T-2 (molécules détaillées dans le Chapitre 2) sur ces cellules épithéliales ont été étudiés à travers l’analyse de la production de ces divers facteurs, regroupés dans le tableau 1.

Facteurs sécrétés par les cellules épithéliales		Implication dans les réponses immunitaires	Autres types cellulaires produisant ces facteurs	Références
Cytokines	IL-1 β , TNF- α	Action pro-inflammatoire et contribue à la différenciation des Th17	} Macrophages et DCs	(Feldmann and Saklatvala, 2004)
	IL-1 α	Action pro-inflammatoire = recrutement des cellules immunitaires (DCs, macrophages, LT, NKT, polynucléaires),		(Krzyszicki et al., 1997)
	TSLP	Sensibilisation des voies respiratoires aux allergènes, initiation des DCs à la différenciation des T naïves en Th2, augmente l’expression de FoxP3 et la différenciation des Tregs		(Brody and Durum, 1989)
	IL-10	Action anti-inflammatoire et participe en combinaison avec TGF- β à la différenciation des Tregs	macrophages, DCs, Th17, Tregs	(Ghanekar et al., 1996)
	TGF- β	Contrôle l’activation et la différenciation des cellules Tregs et Th17	macrophages, DCs, Tregs	(Huston and Liu, 2006)
	IL-6	Participe en combinaison avec TGF- β à la différenciation des Th17	Monocytes/macrophages, DCs, mast cells, LB et T, cellules tumorales, kératinocytes	(Jiang et al., 2006; Lee et al., 2008)
	BAFF APRIL	Intervient dans la prolifération, différenciation, maturation et survie des LB Fonction similaire à BAFF et intervient dans le changement de classe des IgA		(Batten et al., 2000; Schneider et al., 1999)
Chémokines	CXCL8 ou IL-8	Chémoattractante pour les PNN et lymphocytes TCD4 ⁺ T CD8 ⁺	} Macrophages et DCs	(Litinskiy et al., 2002)
	CCL20	Chémoattractante pour les lymphocytes B et T CCR6 ⁺		(Proud and Leigh, 2011)
	CX3CL1	Recrutement des cellules mononuclées CX3CR1 ⁺ (DCs, macrophages, cellules T, cellules NKT)		(McDonald et al., 2007; Sonnenberg et al., 2011)
Autre	Acide rétinoïque	Cofacteur des Tregs, inhibition de la différenciation des Th17		(Fujimoto et al., 2001)
			Cellules épithéliales intestinales	(Farache et al., 2013)

Tableau 1: Cytokines produites par les cellules épithéliales et leurs implications dans les réponses immunitaires

2. Les cellules présentatrices de l’antigène (CPA)

Les cellules présentatrices de l’antigène (CPA) regroupent les macrophages et les cellules dendritiques, ces deux derniers types cellulaires étant considérés comme CPA professionnelles de l’organisme. D’origine myéloïde ou lymphoïde, les CPAs permettent d’établir un lien entre la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire acquise. Elles

jouent un rôle central dans les processus d'activation et de présentation des antigènes aux cellules T impliquées dans l'élimination efficace des agents pathogènes.

2.1. Ontogénèse des cellules présentatrices de l'antigène (CPA)

L'ensemble des CPAs dérivent de **cellules souches hématopoïétiques pluripotentes**. Ces dernières vont donner naissance à des cellules souches myéloïdes appelées **CFU-GEMM** (Colony-Forming Unit-Granulocyte, Erythrocyte, Monocyte/macrophage, Megakaryocyte) à partir desquelles se différencieront les monocytes/macrophages ou les cellules dendritiques (DCs) (figure 5). Les progéniteurs CFU-GEMM se différencient en monocytes sous l'influence de divers facteurs environnementaux tels que l'IL-3, le **GM-CSF** (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) et le **M-CSF** (Monocyte-Colony Stimulating Factor) (Bugarski et al., 2007). Au cours de cette différenciation, ces monocytes acquièrent de nouveaux récepteurs membranaires notamment le MHCII (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II), le CD11a/b/c (récepteurs d'intégrines), le CD14 (élément nécessaire à la reconnaissance de motif bactérien), le CD16 (récepteur du fragment Fc des Ig) et les récepteurs du complément. L'expression de ces éléments permet leur identification phénotypique. **Les macrophages** constituent les cellules issues de la différenciation terminale des monocytes qui a lieu dans les tissus. Les précurseurs CFU-M sont également à l'origine du développement des cellules dendritiques.

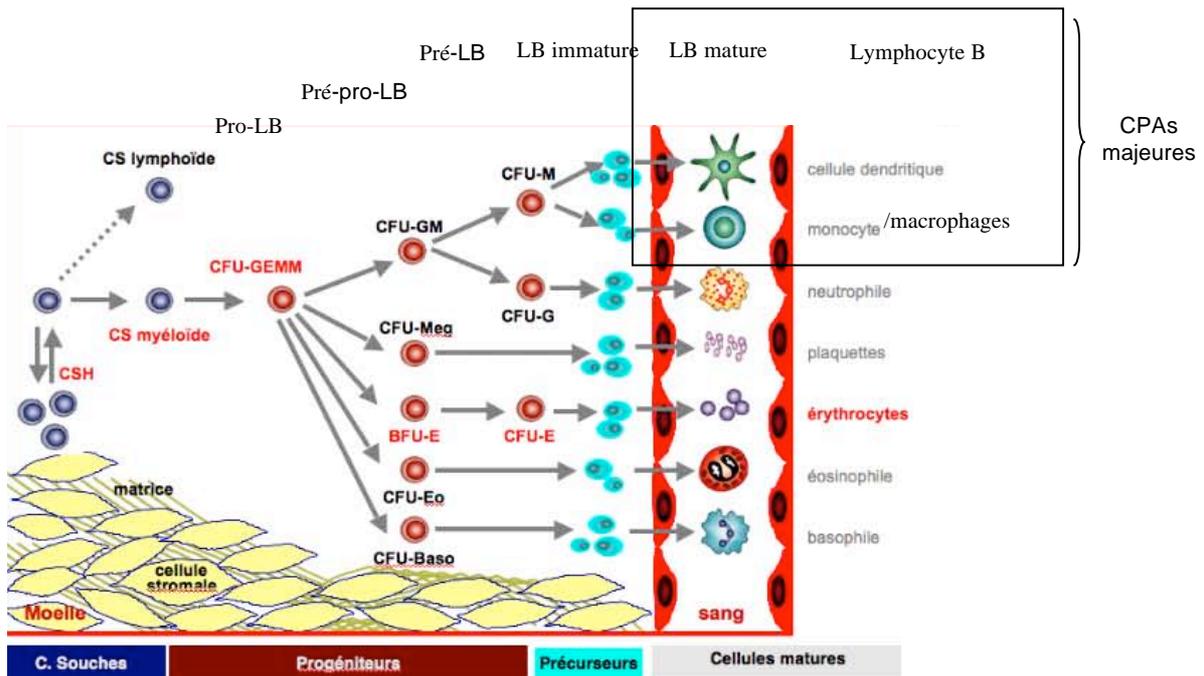


Figure 5: Ontogénèse des cellules présentatrices de l'antigène (CPAs)

Le progéniteur des cellules dendritiques, appelé **DCP** (common-Dendritic Cell Progenitor) génère des cellules dendritiques myéloïdes ou classiques (cDCs) et des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) dont les particularités phénotypiques et fonctionnelles seront détaillées ci-après (cf : 2.3).

2.2. Les macrophages

2.2.1. Localisation et phénotype

Les macrophages sont localisés au niveau des tissus et à des endroits stratégiques dans l'organisme, au sein des muqueuses pouvant faire l'objet d'invasion par des pathogènes. Selon leur environnement cytokinique, les fonctions et le phénotype des macrophages sont très hétérogènes (Gordon and Taylor, 2005). Ainsi, on distingue différents types de macrophages : les cellules de Kupffer dans le foie, les macrophages alvéolaires dans les poumons, les histiocytes dans les tissus conjonctifs, les ostéoclastes dans les os, les microglies dans le système nerveux central, les cellules mésangiales dans les glomérules

rénaux et les macrophages intestinaux au niveau du tractus gastro-intestinal (Taylor et al., 2005).

Chez l'homme comme chez la souris ou le porc, les monocytes/macrophages, les granulocytes et les DCs expriment les marqueurs caractéristiques de la lignée myéloïde tels que le **CD172a** ou le CD14. Le **CD14** appartient à un complexe moléculaire intégrant le TLR4 et permet la reconnaissance du LPS des bactéries Gram- et de sa protéine de liaison, la LPB (LPS-Binding Protein). Chez le porc, les monocytes expriment fortement le CD14 ce qui les différencie des macrophages qui l'expriment faiblement (Gordon and Taylor, 2005). Le **CD172a** ou SIRP α également appelé **SWC3** dans l'espèce porcine (Swine Cluster of Differentiation Workshop 3) est exprimé très tôt par les précurseurs des cellules myéloïdes et est maintenu tout au long de leur différenciation. Il est présent sur les monocytes/macrophages mais également sur les granulocytes et les cellules dendritiques (Chamorro et al., 2005; Ezquerro et al., 2009). Il existe d'autres marqueurs de la lignée myéloïde notamment le **CD11**, qui appartient à la famille des récepteurs aux intégrines. Chez l'Homme, le **CD11b** est exprimé aussi bien par les monocytes sanguins que par les macrophages alvéolaires. Chez le porc, quatre types de CD11 ont été décrits, le CD11a, b, c et d. Contrairement à l'Homme, le CD11b n'est pas exprimé sur les monocytes sanguins porcins et les macrophages alvéolaires, mais est présent sur les granulocytes et sur quelques sous-populations de DCs (Ezquerro et al., 2009).

Chez l'Homme, la différenciation des monocytes en macrophages passe par une augmentation de certains marqueurs représentatifs de leur maturation : le **MHCII** et **CD16** (FcRIII des Ig) et une diminution de l'expression de CD32 (FcRII des Ig). De plus, le **CD203a** chez l'Homme (homologue du **SWC9** dans l'espèce porcine) a été utilisé dans l'étude de la différenciation des monocytes en macrophages. Le marqueur SWC9 est surexprimé au cours de la différenciation des monocytes en macrophages, en particulier sur les macrophages alvéolaires et les cellules de Kupffer (McCullough et al., 1999; McCullough et al., 1997). Le marqueur **SWC1**, marqueur spécifique à l'espèce porcine, est exprimé sur les lymphocytes T, les monocytes et les granulocytes. En revanche, il n'est pas exprimé sur la population de macrophages. Le couplage des marqueurs SWC1 et SWC9 peut alors être utilisé pour différencier un monocyte d'un macrophage, les monocytes sanguins étant SWC9⁻SWC1⁺, alors que les macrophages présentent le phénotype SWC9⁺SWC1⁻.

L'expression du **CD163** chez l'Homme augmente lors de la différenciation des monocytes en macrophages. Ainsi, la présence de CD163 soluble dans le sérum est un indicateur de l'activation macrophagique. Chez le porc, le marqueur CD163 a été crucial pour l'étude de l'hétérogénéité phénotypique des monocytes et des macrophages, et constitue un marqueur de différenciation (Hiraoka et al., 2005).

Cependant, comme énoncé précédemment, le phénotype macrophagique dépend également du tissu dans lequel il se trouve. Ainsi, les macrophages du foie ou cellules de Kupffer expriment fortement les récepteurs au facteur 3 du complément (RC3), les récepteurs de phagocytose et le CD11b. En revanche, elles expriment peu le CD14 et le MHCII. Les macrophages alvéolaires quant à eux expriment plus fortement le récepteur CD14, le récepteur au TNF- α et le MHCII mais faiblement le marqueur CD11b et les récepteurs au complément (Laskin et al., 2001; Stout and Suttles, 2004). Le phénotype de ces deux types macrophagiques diffère également par rapport au phénotype des macrophages différenciés à partir des monocytes sanguins. Ces derniers expriment très fortement le CD14, le CD68, SWC3, CD11c, CD163 et le SWC9 mais faiblement les récepteurs MHCII et CD11b et perdent l'expression de SWC1 suite à la différenciation des monocytes en macrophages (Chamorro et al., 2005; Ezquerro et al., 2009; Gordon and Taylor, 2005; Guillemin and Brew, 2004; Stout and Suttles, 2004). Au niveau intestinal, les macrophages résidents murins sont caractérisés par l'expression d'intégrines à leur surface, à savoir CD11c^{high}, CD11b⁺ mais aussi et exclusivement par des niveaux d'expressions élevés du CX3CR1 (Jung et al., 2000).

En résumé, les différences phénotypiques des macrophages en fonction de leur localisation sont décrites dans le tableau 2.

CPAs Phénotype	Macrophages		DCs		Références
	Intestin	Poumon	Intestin	Poumon	
Marqueurs myéloïdes CD14 SWC3A (SIRP- α ou CD172A)	low (P), + (H) High (P)(H)(S)	low (P), + (H) High (P)(H)(S)	low (P), + (H) High (P)(H)(S)	low (P), + (H) High (P)(H)(S)	(Gordon and Taylor, 2005) (Chamorro et al., 2005) (Ezquerria et al., 2009) (van Rijt et al., 2005)
Marqueurs de maturation MHC II CD16	+ (P), ++ (H) + (P), + (H)	+ (P), ++ (H) + (P), + (H)	+ (P), ++ (H) + (P), + (H)	+ (P), ++ (H) + (P), + (H)	(Laskin et al., 2001) (Stout and Suttles, 2004)
Intégrines CD11a CD11b CD11c CD103 ($\alpha E\beta 7$)	++ (H) + (P)(H)(S) High (P), +(H)(S) + (S)	++ (H) - (P) High (P), +(H)(S) ND	++ (H) High (S) High/low (P), +/- (H) + (S)	++ (H) - (S), + (H) High/low (P), +/- (H) + (S)	(Ezquerria et al., 2009) (Plantinga et al., 2010) (Summerfield and McCullough, 2009) (Scott et al., 2011)
Récepteur aux chémokines CX3CR1 CCR6	High (H) + (H)	+ (H) + (H)	High (H), + (S) + (H)	+ (H) + (H)	(Jung et al., 2000) (van Rijt et al., 2005)
autres CD163 SWC9 SWC1	High (P), + (H) ND ND	High (P), + (H) ND ND	ND ND ND	ND ND ND	(Hiraoka et al., 2005) (McCullough et al., 1997) (McCullough et al., 1999)

Tableau 2: Comparaison phénotypique entre macrophages et DCs en fonction de leur localisation tissulaire (intestin et poumon) selon les différentes espèces : homme (H), souris (S) et porc (P)

2.2.2. Fonctions des macrophages

Du fait de leur large éventail de récepteurs, les macrophages sont doués de multiples fonctions : ils sont mobiles, adhérents, capables de capturer et phagocyter les pathogènes mais également les polynucléaires neutrophiles apoptotiques, les cellules mortes et les débris cellulaires, favorisant ainsi la résolution des processus inflammatoires et le retour à l'homéostasie (Ezquerria et al., 2009).

Ils sont également doués d'action microbicide dépendante de l'oxygène. Cette dernière fait intervenir deux systèmes enzymatiques principaux, la NADPH oxydase et la NO synthase générant respectivement l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ et le monoxyde d'azote NO composés extrêmement toxiques pour les bactéries, les parasites intracellulaires et les cellules tumorales. La myéloperoxydase, autre enzyme active contre certaines bactéries telles qu'*E. coli* et *L. acidophilus*, est aussi présente dans les monocytes. Néanmoins elle disparaît progressivement lors de la maturation macrophagique.

La sécrétion macrophagique est très diversifiée. Ces cellules sont capables de déverser dans le milieu extérieur, lysozyme, élastase, collagénase, mais également différents facteurs tels que des cytokines pro-inflammatoires l'IL-1 β , IFN- α/β , TNF- α , en grande quantité (environ 10 à 100 fois plus que les polynucléaires neutrophiles), des métabolites issus de l'acide arachidonique (prostaglandines, leucotriènes), des facteurs de croissance et de différenciation en monocytes/macrophages tels que le GM-CSF ou le M-CSF. Rivollier *et al.* (2012) ont récemment montré que les macrophages intestinaux CX3CR1⁺ résidents produisent des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1, TNF- α) (Rivollier et al., 2012).

La fonctionnalité des macrophages dépend du milieu dans lequel ils se trouvent. C'est pourquoi certaines cytokines (IFN- γ et TNF- α ou IL-4), chémokines, agonistes adrénergiques ou cholinergiques, acides gras, hormones ou immunoglobulines présentes dans l'environnement proche des macrophages peuvent moduler leur fonction et leur caractéristique phénotypique (Stout and Suttles, 2004). En fonction de la nature de leur milieu, les macrophages dérivés des monocytes dans le foyer inflammatoire se polarisent en deux sous-populations: sous l'influence de l'IFN γ , les macrophages sécrètent des quantités très importantes de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α). Ces macrophages sont alors capables d'éliminer les bactéries qu'ils hébergent. Alors que sous l'influence de l'IL-4 et l'IL-13, les macrophages produisent des cytokines anti-inflammatoires. De récentes publications font état du caractère versatile et plastique des macrophages leur permettant d'adapter la réponse inflammatoire à leur environnement. Chez la souris, il est décrit deux types de macrophages : la population dite « M1 » et la population dite « M2 ». Ainsi les cytokines de type Th1, telles que IFN- γ , IL-1 β ou le motif bactérien lipopolysaccharide (LPS), induisent un état d'activation des macrophages dit « classique » ou M1. Les macrophages M1 sont des cellules effectrices qui détruisent les microorganismes et produisent principalement des cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF α , l'IL-6 et l'IL-12. En revanche, les cytokines Th2, telles que l'IL-4 et l'IL-13 induisent une activation « alternative » ou M2 des macrophages (Gordon, 2003). Les macrophages M2 présentent des propriétés anti-inflammatoires car ils produisent des facteurs tels que l'IL-10, le TGF- β et l'antagoniste du récepteur à IL-1 β (IL-1Ra). Les macrophages M2 sont également impliqués dans l'angiogenèse et ont des capacités de réparation et de remodelage du tissu endommagé.

Les macrophages sont impliqués dans les réponses immunitaires notamment par le biais de la multitude de récepteurs présents à leur surface. Ces derniers sont capables de

reconnaître un large éventail de pathogènes appelés **PAMPs** pour « pathogen-associated molecular pattern ». Parmi ces récepteurs, on compte les **PRRs** pour « pattern-recognition receptors » qui comprennent les NLRs, et l'une des familles de PRR la plus connue et étudiée aujourd'hui : les **TLRs (Toll-like receptors)** qui sont exprimés de façon constitutive sur les macrophages. La localisation des TLRs mais également leurs fonctions seront abordées plus en détail dans le paragraphe 2.4.

Les macrophages, de par la présence sur leur membrane de récepteurs pour le complément (RC3) et pour le fragment Fc des immunoglobulines vont pouvoir adhérer aux cellules cibles infectées (Gordon, 1998). Les macrophages peuvent alors réaliser la phagocytose. Ils émettent des pseudopodes qui entourent la particule à phagocyter et l'englobent. On assiste alors à la création d'une vésicule appelée phagosome dans laquelle viennent se déverser des lysosomes. La digestion est alors sous la dépendance de l'équipement enzymatique (estérases, phosphatases, peroxydases, catalases).

Une de leur action principale repose sur leur rôle pivot dans la présentation des antigènes aux cellules T effectrices. Au niveau intestinal, ces macrophages ont un rôle conséquent dans le maintien de l'homéostasie. En effet, l'équipe de Farache *et al.* (2013) a pu montrer, chez la souris, une activité plus intense de captation de l'ovalbumine présente dans le lumen par ces populations cellulaires via l'utilisation de leurs dendrites trans-épithéliales (TED) en comparaison aux DCs CD103⁺CD11b⁺ (Farache et al., 2013). Par ce mécanisme actif, les macrophages intestinaux sont donc des éléments non négligeables dans la présentation des antigènes aux cellules T naïves et leur voie de différenciation. Selon Denning *et al.* (2007), *in vitro* les macrophages CX3CR1⁺ ont la capacité de différencier des cellules T CD4⁺ naïves en LT régulateurs FoxP3⁺ (Denning et al., 2007). De plus, les macrophages intestinaux ont un rôle critique dans le maintien de l'expression de FoxP3 et de l'activité suppressive des Tregs durant les colites (Murai et al., 2009). **MIF** (Macrophage migration inhibitory factor) est une cytokine exprimée de façon constitutive dans l'intestin et le côlon par les cellules épithéliales, les macrophages ou encore les neurones entériques (Maaser and Kagnoff, 2002). Cette cytokine s'avère être un facteur inflammatoire important. En effet, MIF stimule la production de TNF- α et d'IL-1 β et inhibe la production de glucocorticoïdes limitant la mise en place des voies anti-inflammatoires. L'ensemble de ces deux mécanismes potentialise l'apparition et le maintien des colites (Ohkawara et al., 2005).

2.3. Les cellules dendritiques (DCs)

Les cellules dendritiques (DCs) sont considérées comme les cellules sentinelles de l'organisme vis-à-vis de l'intrusion de micro-organismes. Les DCs peuvent être sous deux états, immatures ou matures. A l'état immature, on les retrouve localisées au niveau des portes d'entrée empruntées par les pathogènes. Elles repèrent les agents infectieux, les ingèrent et relâchent des signaux biochimiques afin d'alerter et d'attirer sur le lieu de l'infection les cellules de la première ligne de défense de l'organisme (polynucléaires neutrophiles, cellules NK, monocytes/macrophages). Une fois l'intrus digéré, les DCs exposent à leur surface des fragments du pathogène : les peptides antigéniques. Elles migrent alors via les vaisseaux lymphatiques jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques, mésentériques). Au cours de cette migration, elles acquièrent de nouveaux récepteurs et de nouvelles fonctions devenant ainsi des DCs matures. Elles possèdent alors la capacité de présenter ces antigènes aux lymphocytes T et B. Ces lymphocytes T et B spécifiques de l'antigène, acteurs de la réponse immunitaire acquise migreront à leur tour vers le site de l'infection pour assurer efficacement son éradication (figure 6).

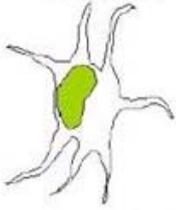
Changements	CD immatures	CD matures
		
Morphologie	Pas de prolongements cytoplasmiques	Apparition de longs prolongements cytoplasmiques qui favorisent les contacts avec les T naifs
Localisation	Tissus périphériques	Organes lymphoïdes
Capture d'antigène	Oui	Non
Reconnaissance de pathogènes	Forte expression des TLR	Diminution de leur expression
Migration	Non	Oui
Molécules CMH de classe I et II	Présence	Sur expression
Molécules d'adhésion et de co-stimulation	Présence	Sur expression
Production de cytokines		IL-12 IL-10
Fonction principale	Capture d'antigène	Cellule présentatrice d'antigène

Figure 6: Principaux changements morphologiques, phénotypiques et fonctionnels au cours de la maturation des cellules dendritiques

Les DCs expriment des molécules de costimulation et de maturation tels que CD80/86 et le MHCII et disposent ainsi de toutes les caractéristiques nécessaires pour l'activation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. On distingue deux grands types de DCs. **Les DCs myéloïdes ou conventionnelles (cDCs)**, (de phénotype CD11c⁺CD123^{low} chez l'Homme), sont capables d'apprêter et de présenter les antigènes mais aussi de sécréter de grandes quantités d'interleukine-12 (IL-12).

Les DCs plasmacytoïdes (pDCs) (de phénotype CD11c⁻CD123^{high} chez l'Homme), doivent leur nom à leur ressemblance morphologique avec des plasmocytes. A l'origine, elles étaient appelées «cellules productrices d'interféron (IFN)» ou NIPCs du fait de leur capacité à produire de grandes quantités d'IFN de type I après activation. Ce parallèle cDCs/pDCs est également retrouvé chez la souris et dans l'espèce porcine aussi bien au niveau pulmonaire qu'au niveau intestinal. Chez la souris comme chez le porc, les cDCs expriment fortement le **CD11c** alors que les pDCs expriment très peu ce marqueur (Plantinga et al., 2010; Summerfield and McCullough, 2009). Cependant, il existe des sous-populations de cDCs basées notamment sur l'expression du marqueur myéloïde **CD11b**. Chez la souris, la majorité des cDCs retrouvées au niveau des voies respiratoires sont CD11b⁻ et expriment l'intégrine CD103⁺ (αEβ7) (GeurtsvanKessel et al., 2008) alors que dans la *lamina propria* les cDCs expriment fortement CD11b, pour certaines CX3CR1 ou encore la molécule SIRPα appelée aussi **CD172A** ou **SWC3A** (van Rijt et al., 2005). La présence de nombreux macrophages présentant les mêmes marqueurs tel que CD11c^{high} au niveau alvéolaire rend leur identification précise difficile (Plantinga et al., 2010). Chez le porc, les pDCs sont identifiées comme CD4^{high}CD172A^{low} (Summerfield and McCullough, 2009).

La population majoritaire de DCs dans le petit intestin est constituée par les cDCs CD11c⁺CD103⁺CD11b⁺. Elles ont la capacité de présenter l'antigène aux cellules T naïves (Farache et al., 2013). La présence de ces DCs CD103⁺ semble maintenir un état d'homéostasie en réponse aux inflammations chroniques grâce à la sécrétion de facteurs régulateurs tels que TGF-β, TSPL ou RA induisant la différenciation des cellules T naïves en Tregs (Scott et al., 2011) (tableau 2).

Les principales cytokines et chimiokines chémo-attractives pour les DCs sont le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), le **MIP-3α** (Macrophage Inflammatory Protein-3α), le CCL20 et le CX3CL1. Ces facteurs sont produits principalement par les tissus enflammés (les épithéliums) ou néoplasiques.

Les populations de macrophages et de cellules dendritiques sont très efficaces dans l'élimination et la présentation des antigènes, car elle possède la capacité de reconnaître un large panel de motifs antigéniques issus de divers pathogènes (bactéries, virus, parasites...) aussi appelés **PAMPs (Pathogen-associated molecular pattern)**. Cette reconnaissance s'effectue via la présence d'une importante diversité de récepteurs membranaires appelés **PRRs (Pattern Recognising Receptors)**, regroupant les NOD-like receptors (NLRs), les RIG-I-like receptors (RLRs), les C-type Lectin receptors (CLRs) et les plus connus les **Toll-like receptors (TLRs)** (Tessarz and Cerwenka, 2008).

2.4. Les récepteurs toll-like (TLRs)

2.4.1. Description générale et expression tissulaire

Découvert en 1996 chez la drosophile, la première fonction des TLRs a été mise en évidence dans la réponse immunitaire antifongique (Lemaitre et al., 1996). L'homologue de ces récepteurs a été découvert chez les mammifères en 1997 (Medzhitov et al., 1997).

Les TLRs peuvent reconnaître de nombreux motifs d'origine bactérienne, fongique, virale ou certains antigènes de l'hôte (par exemple Heat-shock protein ou fibrinogène) (Tableau 3). Aujourd'hui, dix TLRs différents ont été décrits chez l'homme (TLR1-10) et 12 chez la souris (TLR1-9 et TLR11-13) (O'Neill, 2006). Retrouvés sur de nombreux types cellulaires, les TLRs sont exprimés préférentiellement par les DCs et les macrophages (Figure 7).

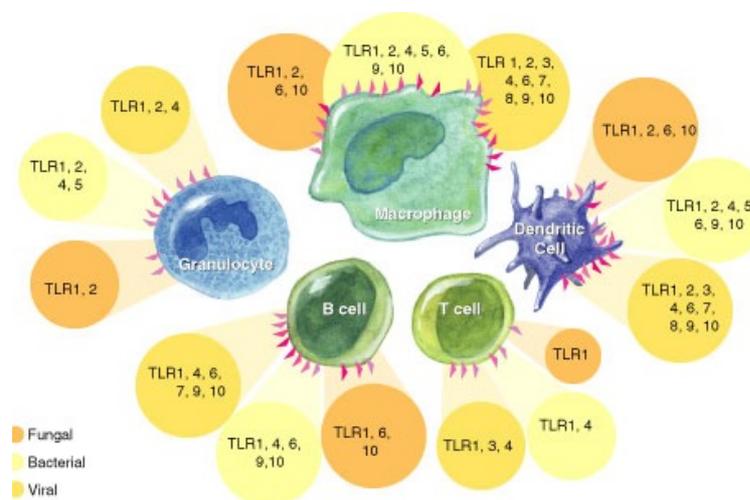


Figure 7: Expression des TLRs en fonction du type cellulaire

Quelle que soit leur origine, ce sont des récepteurs glycoprotéiques transmembranaires très conservés au cours de l'évolution et associés en homo- ou hétérodimère. Leur domaine extracellulaire contient 19 à 25 résidus de leucine appelé motif LRR pour répétition riche en leucine (leucine-rich repeat). Chacun de ces motifs est couplé à une chaîne d'acide aminé de 24 à 29 unités de long. Ces structures sont impliquées dans la liaison à un ligand spécifique (Bowie and O'Neill, 2000). La chaîne intracellulaire contient une région hautement conservée appelée domaine TIR pour Toll-interleukin-1 receptor permettant la transduction du signal d'activation et l'induction des cascades de signalisation (Barton and Kagan, 2009).

Les TLRs sont scindés en deux groupes principaux, ceux retrouvés au niveau de la surface cellulaire (TLR-1, -2, -4, -5, -6, et -10) et ceux retrouvés au niveau des membranes endosomales (TLR-3, -7, -8 et -9) (Takeda and Akira, 2005; Trinchieri and Sher, 2007) (Figure 8). Cependant, au niveau de l'épithélium des muqueuses le TLR4 peut également se localiser au niveau intracellulaire.

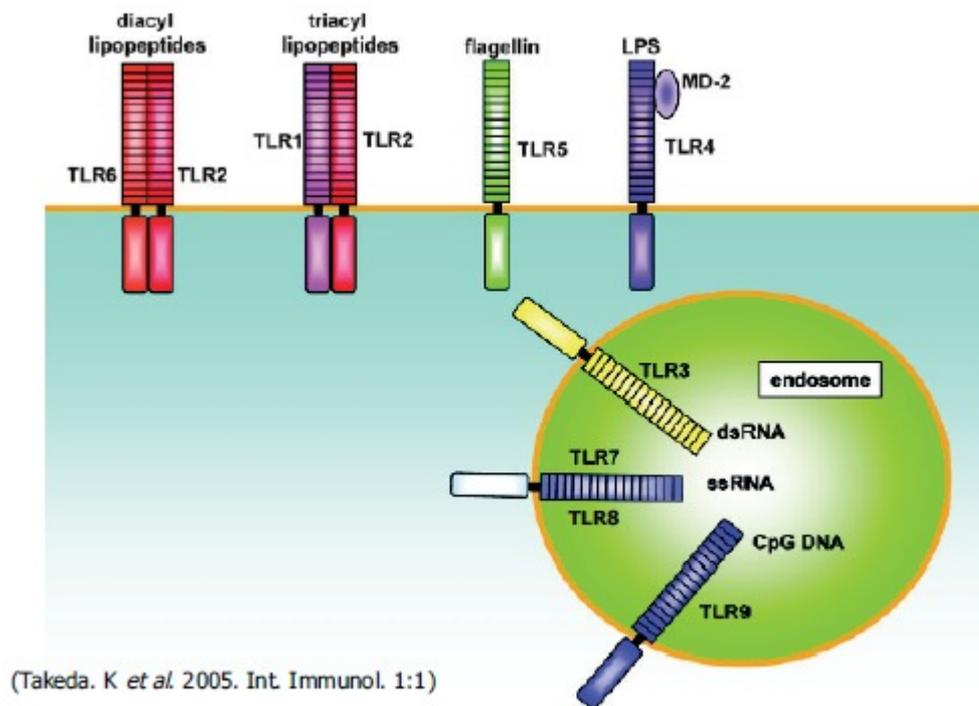


Figure 8: Structure et localisation des TLRs au sein d'une cellule (Takeda K. *et al.*, 2005)

Une partie de ces travaux de thèse se sont centré sur l'étude des réponses aux TLRs de surface (-2, -4 et -6) comme au TLR endosomal (le TLR-7). Ces TLRs répondent à différents motifs qu'ils soient bactériens (di- et tri-acyl lipoprotéiques, acides lipotéïchoïques, LPS) ou

viraux (RNAss, ARN simple brin) et prennent également en compte la compartimentalisation cellulaire des TLRs.

Chez le porc, de récentes études ont montré que l'activation des **TLRs 3 et 7** conduit à la mise en place d'une signalisation cellulaire par leur agoniste spécifique respectivement double et simple brin d'ARN dans des cellules rénales, duodénales, de la rate et du foie permettant de montrer ainsi leur expression et leur fonctionnalité au sein de ces différents tissus. L'expression de ces deux TLRs est modérée dans les cellules issues de la moelle osseuse, des poumons et de la peau (Sang et al., 2008). Le **TLR2** est exprimé dans les sous-populations de leucocytes, monocytes, macrophages et granulocytes mais exemptes sur les populations lymphocytaires (Alvarez et al., 2008). Burkey *et al.* (2009) ont montré une expression constitutive *in vitro* des TLRs -2, -4 et -9 sur des cellules épithéliales de jéjunum porcin et sur des cellules mononucléées phagocytaires (monocytes, macrophages et cellules dendritiques) (Burkey et al., 2009). Ces auteurs observent également une expression constitutive *in vivo* de ces TLRs sur des cellules issues de l'iléon distal porcin. Chaque TLR possède un ligand qui lui est propre. L'ensemble des TLRs couvre ainsi un large éventail de motifs microbiens très conservés leur permettant d'activer la réponse immunitaire inflammatoire spécifique (Akira et al., 2006). Les différents ligands de ces TLRs sont répertoriés dans le tableau 3 selon Akira et al. (2006).

Microbial Components	Species	TLR Usage
Bacteria		
LPS	Gram-negative bacteria	TLR4
Diacyl lipopeptides	<i>Mycoplasma</i>	TLR6/TLR2
Triacyl lipopeptides	Bacteria and mycobacteria	TLR1/TLR2
LTA	Group B <i>Streptococcus</i>	TLR6/TLR2
PG	Gram-positive bacteria	TLR2
Porins	<i>Neisseria</i>	TLR2
Lipoarabinomannan	Mycobacteria	TLR2
Flagellin	Flagellated bacteria	TLR5
CpG-DNA	Bacteria and mycobacteria	TLR9
ND	Uropathogenic bacteria	TLR11
Fungus		
Zyosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TLR6/TLR2
Phospholipomannan	<i>Candida albicans</i>	TLR2
Mannan	<i>Candida albicans</i>	TLR4
Glucuronoxylomannan	<i>Cryptococcus neoformans</i>	TLR2 and TLR4
Parasites		
tGPI-mucin	<i>Trypanosoma</i>	TLR2
Glycosylated phospholipids	<i>Trypanosoma</i>	TLR4
Hemozoin	<i>Plasmodium</i>	TLR9
Profilin-like molecule	<i>Toxoplasma gondii</i>	TLR11
Viruses		
DNA	Viruses	TLR9
dsRNA	Viruses	TLR3
ssRNA	RNA viruses	TLR7 and TLR8
Envelope proteins	RSV, MMTV	TLR4
Hemagglutinin protein	Measles virus	TLR2
ND	HCMV, HSV1	TLR2
Host		
Heat-shock protein 60, 70		TLR4
Fibrinogen		TLR4

Tableau 3 : Composants microbiens reconnus par les TLRs selon Akira et al. (2006)

2.4.2. Fonction des TLRs

L'interaction d'un TLR avec son ligand spécifique permet d'initier deux voies de signalisation majeures. La voie dépendante de **MyD88** active les signaux liés aux **mitogen-associated protein kinase** (MAPK) et au **nuclear factor-kappa B** (NF- κ B) alors que la voie dépendante de **TRIF** active les signaux liés aux **interferon regulatory factors** (IRF-3) (Creagh

and O'Neill, 2006). L'activation de ces voies de signalisation induit la synthèse de cytokines. Les interférons de type I sont produits aussi bien après activation des voies liées aux IRFs qu'à la voie dépendante de MyD88. Les cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α ou IL-1 β sont quant-à elles produites généralement lors de l'activation de la voie NF- κ B (Akira, 2009; Kawai and Akira, 2009) (Figure 9).

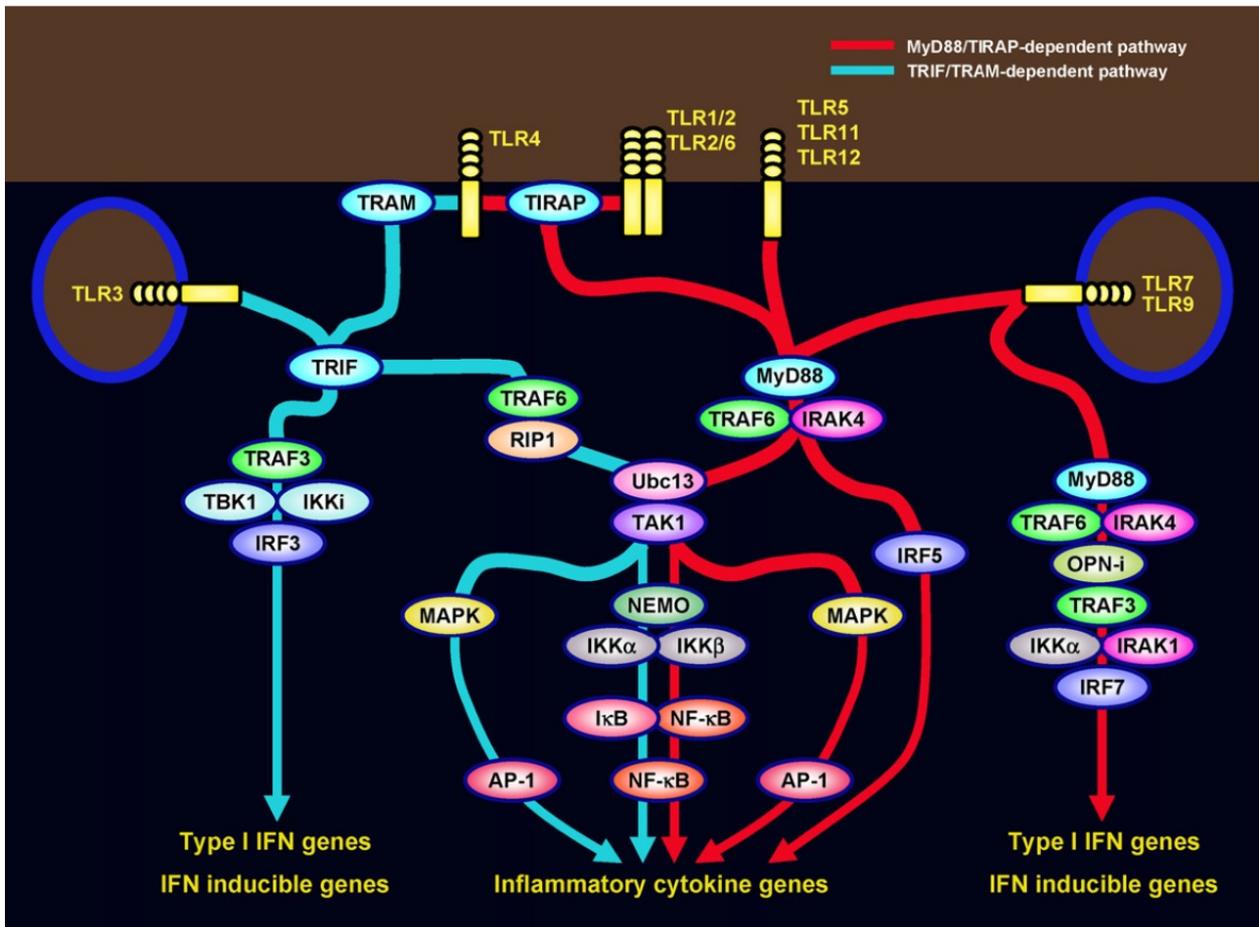


Figure 9: Différentes voies de signalisation induites par l'interaction TLR - TLR-ligand (Kawai and Akira, 2009)

La reconnaissance entre un PAMP et son PRR constitue la première étape de la mise en place d'une réponse immunitaire dite réponse innée. Cette réponse va permettre l'élimination des antigènes étrangers par le recrutement des cellules polynucléaires et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires au niveau du site infecté. En cas d'inflammation prolongée, la présentation des peptides antigéniques par les CPA (macrophages, DCs ou lymphocytes B) aux lymphocytes T, associé à une réponse cytokinique adaptée, aboutira à la mise en place de l'immunité effectrice (Kawai and Akira, 2009).

3. Les lymphocytes, effecteurs de l'immunité

Les lymphocytes sont produits dans la moelle osseuse et poursuivent leur maturation dans ce tissu ou dans le thymus. Leur domiciliation dans les organes lymphoïdes est sous le contrôle de l'environnement cytokinique et de nombreux signaux moléculaires. Parmi les lymphocytes, on distingue les lymphocytes **B**, les lymphocytes **NKT** et les lymphocytes **T**. Les lymphocytes T peuvent exprimer deux types de **TCR**, le **TCR $\alpha\beta$** et le **TCR $\gamma\delta$** .

Les lymphocytes T $\alpha\beta$ expriment les molécules **CD4** et/ou **CD8**. De façon classique ce sont les déterminants majeurs des deux types de lymphocytes : **les lymphocytes T auxiliaires appelés « helper » (Th)** exprimant la molécule CD4⁺ et **les lymphocytes cytotoxiques (Tc)** exprimant la molécule CD8⁺. Cependant, les lymphocytes T mémoires co-expriment ces 2 molécules. CD4 et CD8 sont également importantes pour distinguer les différents stades de maturation des thymocytes au cours de l'ontogénie. En fonction des facteurs de transcription induits et de l'environnement cytokinique, les cellules Th se différencient en Th effectrices (Th1, Th2 ou Th17), en cellules régulatrices des réponses T effectrices : les Tregs ou en cellules T cytotoxiques. L'ensemble de ces réponses effectrices sont impliqués dans la lutte contre les agents pathogènes (figure 10).

helper de type 2 (Th2). Les cellules Th1 se différencient à partir de cellules T CD4⁺ naïves en présence d'IL-12 alors que les Th2 se différencient à partir de cellules T CD4⁺ naïves en présence d'IL-4 et en absence d'IL-12. Les cellules Th1 régulent l'immunité cellulaire et sont impliquées majoritairement dans l'élimination des pathogènes intracellulaires, bactéries et virus via la production d'IL-2 et d'interféron gamma (IFN- γ) (Mosmann and Sad, 1996) alors que les cellules Th2 régulent l'immunité humorale et sont impliquées principalement dans l'élimination des parasites (helminthes et autres vers) via la production d'IL-4, -5, -9 et -13. En revanche, les lymphocytes Th2 ne produisent pas d'IFN- γ (Romagnani, 1991). Les cellules Th1 et Th2 expriment également différents facteurs de transcription, le plus important est **T-bet** pour les Th1 et GATA-3 pour les Th2 respectivement (figure 10).

De récentes études ont pu mettre en évidence chez l'Homme comme dans d'autres espèces animales (souris, porc...), une nouvelle sous-population de lymphocytes Th appelées **Th17** montrant ainsi que les Th1 et les Th2 n'étaient pas les seules Th effectrices (Cua et al., 2003; Harrington et al., 2005).

Les lymphocytes Th ont un rôle majeur dans la coordination des réponses immunitaires, notamment dans l'aide (« help » en anglais) apportée aux différentes sous-populations de lymphocytes (B ou Tc). Les cellules Th recrutent et amplifient l'action des cellules de l'immunité innée (polynucléaires neutrophiles, cellules NK, monocytes/macrophages, cellules dendritiques). Il est important de signaler qu'il existe une certaine plasticité entre les différents profils de lymphocytes Th (Th1, Th2 ou Th17). Cette plasticité est sous le contrôle de modifications épigénétiques mais est aussi due à une adaptation mise en place par les cellules T effectrices selon le contexte immunologique dans lequel elles se trouvent. Par exemple, des cellules Th17 peuvent, sous l'effet de l'IL-12, produire de l'IFN- γ plus caractéristique d'un profil Th1 (cf : chapitre 1. C).

3.2. Les lymphocytes Th17

Le premier article décrivant non pas des « cellules CD4⁺ produisant de l'IL-17 » mais **des cellules T helper 17 « Th17 »** est paru en 2005 et a permis de différencier les lymphocytes Th17 des classiques sous-populations lymphocytaires Th1 et Th2 (Harrington et al., 2005). Egalement d'origine thymique, les Th17 se différencient elles aussi à partir des cellules T CD4⁺ naïves mais dépendent d'un environnement cytokinique spécifique (IL-6, IL-23, IL-1 β ,

TGF- β) nécessitant l'initiation de facteurs de transcription spécifiques. La population lymphocytaire Th17 est décrite comme produisant majoritairement des cytokines pro-inflammatoires **IL-17A**, mais également de l' **IL-17F**, **IL-21**, **IL-22**, **TNF- α** et IL-10 ou encore de l'IL-26 chez l'Homme (Ouyang et al., 2008).

Bien que les effets délétères des Th17 aient été mis en évidence dans de nombreux contextes pathologiques tels que l'asthme ou les maladies auto-immunes, des propriétés protectrices commencent à leur être associées. En effet, il a été montré par différentes équipes un rôle anti-fongique, anti-bactérien et même anti-viral de cette sous-population (Brenchley et al., 2008; Louten et al., 2009; van de Veerdonk et al., 2009). Les patients présentant des mutations pour le gène **STAT3** (Signal transducer and activator of transcription 3), facteur de transcription impliqué notamment dans la différenciation en Th17, sont les plus atteints par une candidose chronique (Dominguez-Villar and Hafler, 2011). De plus, les souris déficientes en IL-17 ou IL-17R sont plus susceptibles à l'infection par *Klebsiella pneumoniae* (Louten et al., 2009; Puel et al., 2011). L'essentiel de l'action protectrice des Th17 provient de leurs capacités à sécréter des cytokines pro-inflammatoires et chémo-attractrices (IL-17, IL-21 et IL-22).

3.2.1. Différenciation des cellules Th17

La différenciation des cellules T CD4⁺ naïves en cellules Th17 dépend essentiellement de la présence des certaines cytokines et de l'activation des facteurs de transcription.

3.2.1.1. Cytokines impliquées

La différenciation des cellules T naïves en Th17 est influencée par de nombreux facteurs dont le **TGF- β** (cf : paragraphe I. B.1), l'**IL-6** et l'**IL-21** (Jager and Kuchroo, 2010; Stockinger and Veldhoen, 2007; Weaver et al., 2007). Cependant, selon l'espèce ou les modèles *in vitro* utilisés, il semble qu'il existe de multiples combinaisons de cytokines capables d'induire la différenciation des Th naïves en Th17 (Figure 11).

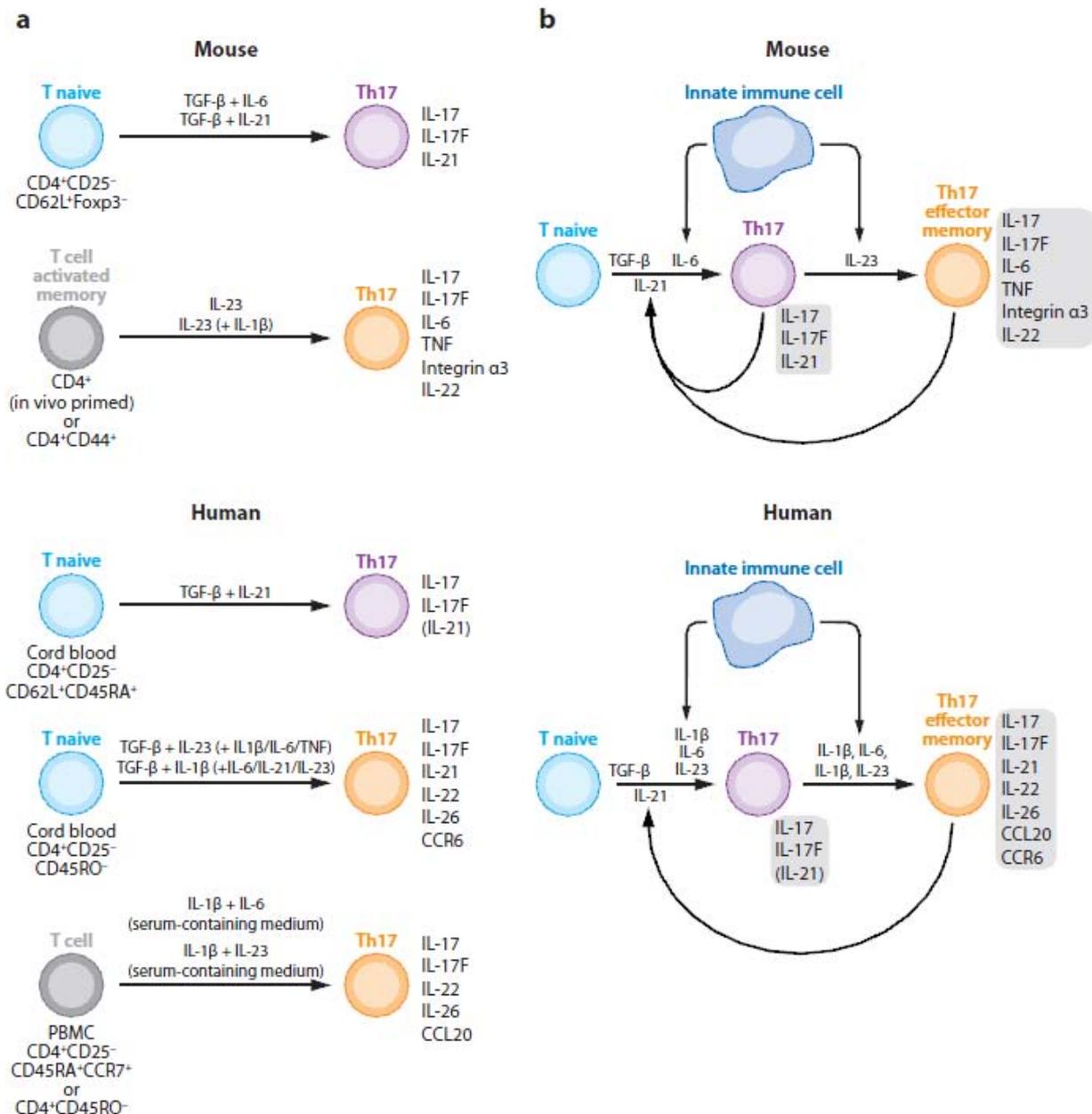


Figure 11: Différenciation des lymphocytes Th naïves en Th17 selon le modèle souris (A) ou le modèle humain (B) : Implication de l'environnement cytokinique

La différenciation des Th17 est provoquée par la co-exposition à deux cytokines : l'IL-6 et le TGF-β (Bettelli et al., 2006; Infante-Duarte et al., 2000; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006a). Chez la souris, l'IL-6 induit la phosphorylation de STAT3 (Yang et al., 2007). En absence d'IL-6, la différenciation en Th17 peut également se faire par une co-exposition des cellules T naïves au TGF-β et à l'IL-21 (Korn et al., 2007; Nurieva et al., 2007; Zhou et al., 2007) mais l'IL-6 induit plus fortement cette différenciation. De plus, les cellules Th17 elles-

mêmes produisent de l'IL-21 capable d'agir de façon autocrine sur leur différenciation et leur amplification. D'autres cytokines pro-inflammatoires semblent également avoir un rôle dans la différenciation des Th17. C'est le cas de l'**IL-1 β** produit principalement par les polynucléaires ou les macrophages qui lorsqu'il est en présence d'IL-6 induit dans le modèle murin une différenciation en Th17 (Chung et al., 2009). De plus, une étude montre aussi que des souris déficientes pour le gène IL-6 génèrent moins de Th17 et que leur répertoire T est dominé par la présence de Tregs (Samoilova et al., 1998).

Cependant, les mécanismes de différenciation de la voie Th17 sont complexes et les avis sont controversés. Pour certains auteurs, le développement des Th17 est indépendant du TGF- β et de l'IL-6 (Wilson et al., 2007) tandis que pour d'autres, la différenciation des Th17 est dépendante de la présence conjointe de TGF- β , d'IL-6, d'IL-1 β et d'IL-23 (Volpe et al., 2008; Wilson et al., 2007; Zhou et al., 2009). Bettelli *et al.* (2006) appuient cette dernière théorie et prouvent que des souris sur-exprimant le TGF- β ont une augmentation de la génération des Th17 et un développement aggravé de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), modèle pathologique murin pour la sclérose en plaque (Bettelli et al., 2006). De nombreux auteurs s'accordent à dire que le TGF- β joue un rôle essentiel dans la différenciation Th17 chez l'homme comme chez la souris. Cependant, même si cette cytokine semble indispensable pour la génération de ce type cellulaire, de fortes concentrations en TGF- β inhibent la production de nombreuses cytokines effectrices des Th17 et ainsi la génération des Th17 pour promouvoir à l'inverse l'expression du facteur de transcription FoxP3 participant ainsi à la différenciation des cellules T naïves en Tregs. Au vue de cette observation, les cellules Th17 et Tregs partagent donc un facteur de différenciation commun, le TGF- β (Peterson, 2012).

3.2.1.2. Facteurs de transcription impliqués

Actuellement, quatre facteurs de transcription sont connus pour être impliqués dans le développement des Th17 chez la souris: **les récepteurs retinoic acid-related orphan (RORs)**, les plus spécifiques du développement Th17, **l'IFN-regulatory factor 4 (IRF-4)**, **STAT3** et **l'aryl-hydrocarbon receptor (AhR)** (Korn, 2009) (Figure 12).

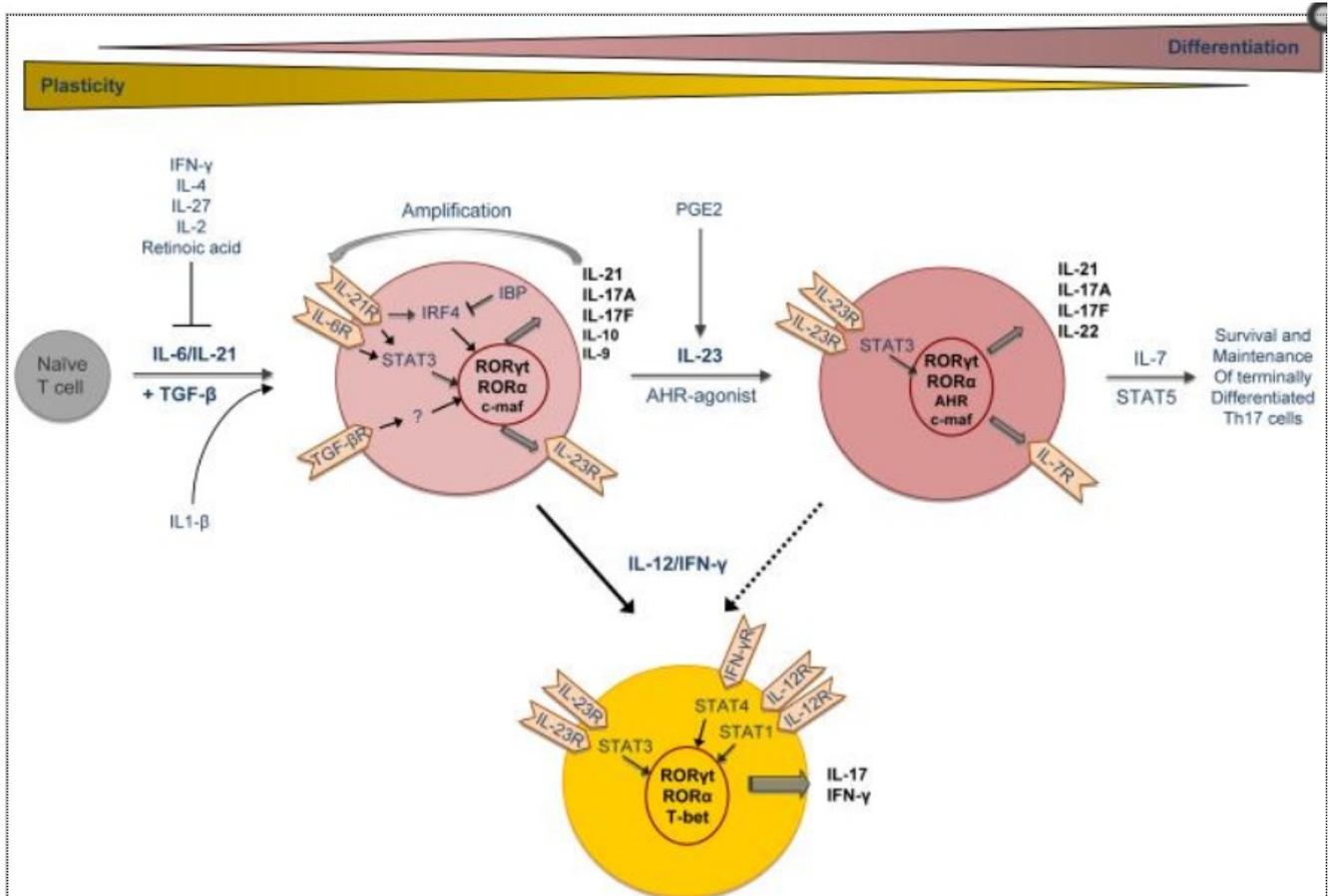


Figure 12: Différenciation des lymphocytes Th naïves en Th17 : Implication des facteurs de transcription

Les récepteurs retinoid acid-related orphan (RORs) appartiennent à une famille bien distincte de récepteurs nucléaires et regroupent les récepteurs ROR alpha (α), bêta (β) et gamma (γ). De récentes études ont montré chez des souris déficientes en récepteurs RORs que ces derniers étaient impliqués dans la régulation de nombreux processus biologiques tels que l'organogénèse, le rythme circadien ou l'immunité mais interviennent également dans diverses pathologies telles que l'arthérosclérose, l'ostéoporose ou le cancer (Jetten and Ueda, 2002). Les cellules Th17 expriment deux types de récepteurs RORs, **ROR α** et **ROR γ t**. ROR γ t est exprimé de façon préférentielle par les cellules Th17 et apparaît nécessaire pour la production d'IL-17. Cependant, bien que réduite chez des souris déficientes pour le gène ROR γ t, les cellules productrices d'IL-17 ne sont pas absentes. ROR α et ROR γ t sont tous les deux induits en présence d'IL-6 ou d'IL-21 et par de faibles concentrations de TGF- β .

L'induction de ROR γ t est dépendante de **STAT3** lequel est préférentiellement activé par l'IL-6, l'IL-21 et l'IL-23 (Yang et al., 2007). Une sur-expression de la forme active de **STAT3** peut augmenter la production d'IL-17 (Harris et al., 2007). De plus, STAT3 a la capacité de se lier directement aux promoteurs de l'IL-21 et de l'IL-17 (Wei et al., 2007).

D'autres facteurs de transcription, notamment **IRF-4**, sont également impliqués dans les voies de différenciation des cellules Th17. **IRF-4** a été précédemment associé à la différenciation des cellules Th1 et Th2 mais il est également requis pour la différenciation des cellules Th17 (Brustle et al., 2007). En effet, dans le modèle souris, sa mutation induit une diminution de la production d'IL-17 et une résistance de ces animaux à l'EAE. Il est important de souligner que la sur-expression de ROR γ t chez des souris déficientes en IRF-4 n'induit pas la restauration de la production d'IL-17 à un niveau basal (Brustle et al., 2007).

Le dernier facteur de transcription impliqué dans la voie Th17 est **AhR**. Différents ligands d'AhR peuvent directement agir sur le développement et l'expansion des Th17, notamment en augmentant l'expression de ROR γ t (Crome et al., 2009). Par exemple, la flagelline, récepteur du TLR-5, est connue pour moduler l'expression d'AhR et induire ROR γ t. De récentes études ont également montré que des ligands d'origine chimique (xénobiotiques) tels que la dioxine et les composés relatifs à la chimie du pétrole sont également capables d'initier la voie Th17 à travers l'activation du facteur de transcription AhR (Quintana et al., 2008; Veldhoen et al., 2008).

3.2.2. Profil cytokinique associé aux cellules Th17

Parmi la production de molécules générées par les Th17, on retrouve principalement les cytokines et chémokines inflammatoires telles que l'**IL-17A**, l'**IL-17F**, l'**IL-21** et l'**IL-22**.

L'**IL-17** a été clonée et décrite par l'équipe de Rouvier *et al.* en 1993 (Rouvier et al., 1993). Les IL-17 appartiennent à une famille de cytokine composée de 6 cytokines allant de l'IL-17A à l'IL-17F. L'**IL-17A** et l'**IL-17F** sont les principales cytokines sécrétées par les cellules Th17 leur donnant ainsi leur nom de Th17 (Fossiez et al., 1998). Les cibles essentielles de l'IL-17 sont nombreuses et regroupent toutes les cellules exprimant les récepteurs à l'IL-17 (IL-17RA et IL-17RC) à savoir, les cellules immunitaires (lymphocytes B et T) (Silva et al., 2003), les cellules endothéliales et les cellules épithéliales (Hu et al., 2010; Yao et al., 1995). La sécrétion d'IL-17 induit l'activation de ces cellules cibles s'accompagnant de la production de

divers facteurs tel que des cytokines (IL-6, IL-1 β , TNF- α) ou des chémokines (CXCL-1, -2, -5, -6, -8, -9, -11 et CCL-2 et -20) (Hu et al., 2011; Huang et al., 2007; Ouyang et al., 2008). Ces facteurs solubles induisent un recrutement de cellules immunitaires, notamment des neutrophiles permettant ainsi l'élimination des pathogènes extracellulaires (Weaver et al., 2007). La présence d'IL-17 attirerait principalement les neutrophiles en induisant une importante production d'IL-8 et de TSLP par les cellules épithéliales. L'IL-17 induit également la sécrétion de protéines anti-microbiennes et de gènes impliqués dans le remodelage tissulaire (Korn, 2009). Cependant, si les fonctions biologiques de l'IL-17 et leur rôle dans les pathologies auto-immunes sont bien décrits chez l'Homme et la souris, ces informations sont limitées pour les autres espèces et notamment l'espèce porcine. Kiros et son équipe ont pu montrer en 2011, la présence de cellules productrices d'IL-17 au niveau de la muqueuse pulmonaire, dans le thymus ainsi qu'au niveau circulatoire chez des porcelets. Ces mêmes auteurs ont également mis en évidence l'expression de transcrite d'ARNm IL-17 dans la peau, le cœur et le tissu intestinal (Kiros et al., 2011). Récemment, l'équipe de Stepanova s'est proposée de caractériser phénotypiquement les cellules productrices d'IL-17 chez le porc (Gerner et al., 2009; Piriou-Guzylack and Salmon, 2008; Stepanova et al., 2012). La conclusion de ces travaux indique que les LT CD3⁺CD4⁺ et les LT CD3⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺ sont capables de produire de l'IL-17 chez cette espèce. Ces dernières seraient responsables du recrutement des neutrophiles au cours des premières étapes d'un épisode infectieux.

Identifiée par Parrish-Novak *et al.* en 2000, l'**IL-21** est produite par les cellules NK ou les cellules T activées et également de façon autocrine par les lymphocytes Th17 au cours de leur différenciation (Parrish-Novak et al., 2000). L'équipe d'Huber et al. (2008) montre que la différenciation et l'auto-amplification des Th17 par l'IL-21 est médiée par le facteur IRF-4 (Huber et al., 2008). Outre son action sur les lymphocytes T CD4⁺, cette cytokine agit également sur d'autres cibles telles que les lymphocytes T CD8⁺ et les cellules NK en améliorant leur pouvoir cytotoxique. Cette cytokine apparaît avoir un rôle important également dans l'expansion des cellules B (Korn et al., 2007). De plus, elle agit sur la différenciation des DCs et des macrophages et induit la prolifération des cellules épithéliales (Spolski and Leonard, 2008a, 2008b).

L'**IL-22** appartient à la famille de l'IL-10. Produite par les cellules Th17 en fin de différenciation, elle est sécrétée en réponse à l'IL-23. Il est à noter cependant que les Th17 ne sont pas les principales sources de production de cette cytokine qui est largement

produite par **les cellules lymphoïdes innées (ILC)** qui feront l'objet d'un paragraphe spécifique (cf : 3.4.1) (Philip and Artis, 2013). Les récepteurs de l'IL-22 sont exprimés essentiellement sur les cellules résidentes localisées dans les muqueuses et notamment les cellules épithéliales. Les voies de signalisation des MAP Kinases et de STAT3 sont engagées par l'IL-22 (Lejeune et al., 2002). De plus, l'IL-22 joue un rôle important dans l'immunité innée de la peau et induit l'expression de peptides anti-microbiens par les kératinocytes (Wolk et al., 2004). Des observations *in vitro* prouvent qu'une stimulation des cellules épithéliales intestinales par l'IL-22 augmente l'expression des molécules pro-inflammatoires IL-8 et TNF- α (Brand et al., 2006). Si la présence d'IL-22 contribue au potentiel pathogénique des Th17, il a aussi été montré que cette interleukine avait une action protectrice dans le foie (Zenewicz et al., 2007) et l'intestin (Sugimoto et al., 2008). L'IL-22 participe donc aux défenses de l'hôte, tend à contrôler l'inflammation et la réparation tissulaire (Ouyang and Valdez, 2008). En effet, elle stimule la production de β -défensine et augmente ainsi la prolifération des IECs ce qui suggère un rôle potentiel dans la reconstruction et la restitution des fonctions de la barrière épithéliale (Maloy and Kullberg, 2008).

Contrairement aux cytokines précédemment décrites, **l'IL-23**, cytokine de la famille de l'IL-12 n'influence pas la différenciation des Th17 au début de leur différenciation (Jager and Kuchroo, 2010; Soumelis and Volpe, 2008). En revanche, l'IL-23 agit sur les Th17 déjà différenciés en augmentant fortement leur expansion *in vitro* (Veldhoen et al., 2006a) et *in vivo* (Veldhoen et al., 2006b). Elle joue également un rôle majeur dans le maintien des fonctions effectrices des Th17 (Stockinger and Veldhoen, 2007). L'IL-23 peut également induire des cytokines effectrices inflammatoires (IL-17, IL-1, TNF- α et IL-6) (Uhlir et al., 2006) et supprimer des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 (Korn, 2009). Produite principalement par les cellules dendritiques et les macrophages, l'IL-23 induit la production d'IL-22 par les ILCs et favorise leur expansion. Les cellules Th17 sont étroitement liées à la cytokine pro-inflammatoire IL-23. En effet, chez la souris, une mutation du gène codant pour l'IL-23 a pour conséquence la diminution du nombre de Th17 et une protection contre les maladies auto-immunes telle que la EAE (Langrish et al., 2005). Chez des souris, le développement de l'inflammation intestinale dépend essentiellement de la présence d'IL-23 qui, lorsque son expression est diminuée, provoque une régression de cette inflammation. La présence d'IL-23 est donc fortement liée à la présence de maladie inflammatoire intestinale (IBD) et ainsi certains variants retrouvés dans les parties non-codantes du gène IL-

23R sont associés à une augmentation de la susceptibilité des individus à la maladie de Crohn (Duerr et al., 2006), au psoriasis ou à d'autres maladies auto-immunes humaines (Cargill et al., 2007; Liu et al., 2008).

Une synthèse de l'ensemble des fonctions des cellules sécrétrices de cytokines est regroupée dans le tableau 4.

		Implication dans les réponses immunitaires	Produits par...	Références
Cytokines produites par les Th17	IL-17A	<ul style="list-style-type: none"> - Induit l'activation des cellules cibles (cellules immunitaires, endothéliales et épithéliales) - Action pro-inflammatoire induisant le recrutement des DCs, macrophages, LT, NKT et polynucléaires 	Th17, ILC17 et ILC22, DCs, macrophages, cellules épithéliales	(Hu et al., 2010; Yao et al., 1995) (Hu et al., 2011; Huang et al., 2007; Ouyang et al., 2008)
	IL-21	<ul style="list-style-type: none"> - Implication dans le processus de différenciation des Th17 - Améliore le pouvoir cytotoxiques des LT CD8⁺ et NKT - Rôle dans l'expansion cellulaire des LB - Agit sur la différenciation des DCs et des macrophages 		(Korn et al., 2007) (Korn et al., 2007) (Spolski and Leonard, 2008a et b)
	IL-22	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de son expression en présence d'IL-8 et de TNF-α - Induit l'expression de peptides anti-microbiens - Protection d'une inflammation dans le foie ou l'intestin - Participe à la reconstruction de l'épithélium intestinal en favorisant la prolifération des IECs 		(Brand et al., 2006) (Wolk et al., 2004) (Zenewicz et al., 2007; Sugimoto et al., 2008) (Ouyang and Valdez, 2008)
Cytokine non produite par les Th17	IL-23	<ul style="list-style-type: none"> - Action sur les Th17 déjà différenciées - Permet l'expansion et le maintien des fonctions effectrices des Th17 - Induction de cytokines pro- (IL-6, IL-1, IL-17, TNF-α) et anti- (IL-10) inflammatoire 		(Veldhoen et al., 2006a et b) (Stockinger and Veldhoen, 2007) (Korn, 2009)

Tableau 4: Synthèse de l'ensemble des rôles et des cellules productrices des cytokines affiliées au profil de sécrétion des cellules Th17

3.3. Nouvelles sous-populations de Th

De récentes études montrent qu'il existerait d'autres cellules Th notamment les Th22 et les Th9. Les Th22 appartiennent à un nouveau type de lymphocytes T auxiliaires immunocompétents bien distincts des cellules Th17 avec une expression génique et des fonctions différentes. Les Th22 semblent être impliqués dans la supervision et la coordination des cellules T qui provoquent l'inflammation (Zhang et al., 2011). En effet, il a

été révélé que les cellules Th22 produisent une molécule de signalisation appelée interleukine-22 (IL-22) (cf paragraphe précédent : 3.2.2). Cette molécule lance un signal « préalable » aux tissus pour les avertir qu'une infection ou qu'une réaction inflammatoire est susceptible de se produire. Ainsi, chez les personnes saines, les cellules Th22 ont un effet protecteur alors que l'expression d'IL-22 est augmentée dans diverses pathologies tels que les maladies de Crohn ou le psoriasis (Zhang et al., 2011). Les cellules Th22 font l'objet d'une attention particulière par la communauté scientifique afin de clarifier leur rôle dans les maladies inflammatoires.

Récemment, il a été montré que l'IL-4 combiné au TGF- β induit la différenciation des lymphocytes T en cellules Th9, une population nouvellement décrite dont le facteur de transcription reste encore inconnu (Dardalhon et al., 2008). Capable de produire de l'IL-9 et de l'IL-10, elle peuvent être induites à partir de cellules Th2 (Niedzwiedzka-Rystwej et al., 2013) et interviennent au sein de l'intestin dans l'élimination des helminthes (Khan et al., 2003).

3.4. Autres types cellulaires capables de sécréter des cytokines

inflammatoires type IL-17, IL-22

Bien que les cellules CD4⁺T $\alpha\beta$ ⁺ Th17 soient les mieux décrites comme source de production d'IL-17, d'autres types cellulaires sont capables de sécréter cette cytokine. C'est le cas des neutrophiles, des mastocytes (Cua and Tato, 2010), ainsi que des cellules T CD8⁺ et des cellules T appartenant à la lignée innée incluant les cellules T $\gamma\delta$ et les cellules invariant natural killer (iNKT) (tableau 5) (Coquet et al., 2007; Kim and Jordan, 2012; Sutton et al., 2012).

Cellules T	Cytokines	Cytokines requises	Facteurs de transcriptions
CD4+ α TCR+ Th17	IL-17, IL-17F, IL-22	IL-6, TGF- β , IL-1 β , IL-23	ROR γ t, ROR α , AhR, IRF-4
CD4+ α TCR+ nTh17	IL-17, IL-17F, IL-22	IL-6, TGF- β	ROR γ t
CD1d-tetramer+ NK1.1 – CD4-	IL-17	TGF- β	ROR γ t
Cellules IL-17+ iNKT	IL-17		
CD27 – γ δ TCR+	IL-17	TGF- β	ROR γ t
Cellules T IL-17+ γ δ TCR+	IL-17		

Tableau 5: Résumé des types cellulaires T producteurs d'IL-17 (d'après Kim et Jordan, 2012)

Découvertes récemment, les **cellules lymphoïdes dites innées appelées ILCs** sont capables de produire des profils cytokiniques similaires aux Th17. Cependant, la présence d'IL-7 et du facteur **Id2** (Inhibitor of DNA binding-2) est un prérequis indispensable pour leur différenciation (paragraphe 3.4.1). Ainsi l'IL-17 peut être produite aussi bien par les cellules de l'immunité innée que des cellules de l'immunité acquise (Mucida et al., 2007).

3.4.1. Les ILCs

Les ILCs représentent une nouvelle famille d'effecteurs hématopoïétiques impliqués dans les réponses innées vis-à-vis des micro-organismes infectieux, dans la formation des tissus lymphoïdes et la reconstruction des tissus. Ces cellules sont très proches phénotypiquement des cellules NKT ou des cellules LTi (Lymphoid tissue inducer cells). **Les LTi** sont des cellules présentes dans les organes lymphoïdes qui produisent la lymphotoxine (LTa1b1) et du TNF- α permettant la stimulation de la production de chémokines et de molécules d'adhésion essentielles pour l'organogénèse lymphoïde (Strober, 2010). Ces cellules interviennent dans l'immunité innée. Elles ne se développent pas dans le thymus et n'ont pas de récepteurs spécifiques des antigènes. Cependant, elles ont la capacité de répondre aux cytokines produites lors d'une réaction immunitaire. Les LTi expriment le facteur de transcription ROR γ t et le récepteur à l'IL-7 (IL-7R α ou CD127) nécessaires pour leur génération (Eberl et al., 2004). **Les cellules NK** tout comme les LTi sont des cellules

appartenant à l'immunité innée et dérivent elles aussi d'un progéniteur lymphoïde dont la maturation se fait dans la moelle osseuse et non dans le thymus. Douées d'une cytotoxicité cellulaire non spécifique, elles sont capables de sécréter de l'IFN γ et du TNF- α .

Contrairement aux cellules NK, les ILCs sont non cytotoxiques et produisent très peu d'IFN- γ . Parmi elles, certaines ont la capacité de produire de l'IL-17 (**ILC17**) ou de l'IL-22 (**ILC22**) appartenant ainsi aux ILCs du groupe 3 (ILC3s) selon la récente nomenclature proposée par Spits en 2013 (Spits et al., 2013) (Philip and Artis, 2013). Ces dernières semblent représenter **la version innée des Th17** (Spits and Di Santo, 2010). Tous les précurseurs d'ILC et les ILCs expriment **Id2**, facteur nécessaire à leur développement. Les précurseurs d'ILCs se différencient en sous-populations d'ILCs via deux signaux : la présence d'IL-7 et l'induction des facteurs de transcription ROR γ t et/ou AhR qui favorisent la différenciation de ces ILCs précurseurs en ILC17 et ILC22 (Cherrier et al., 2012) (Figure 13).

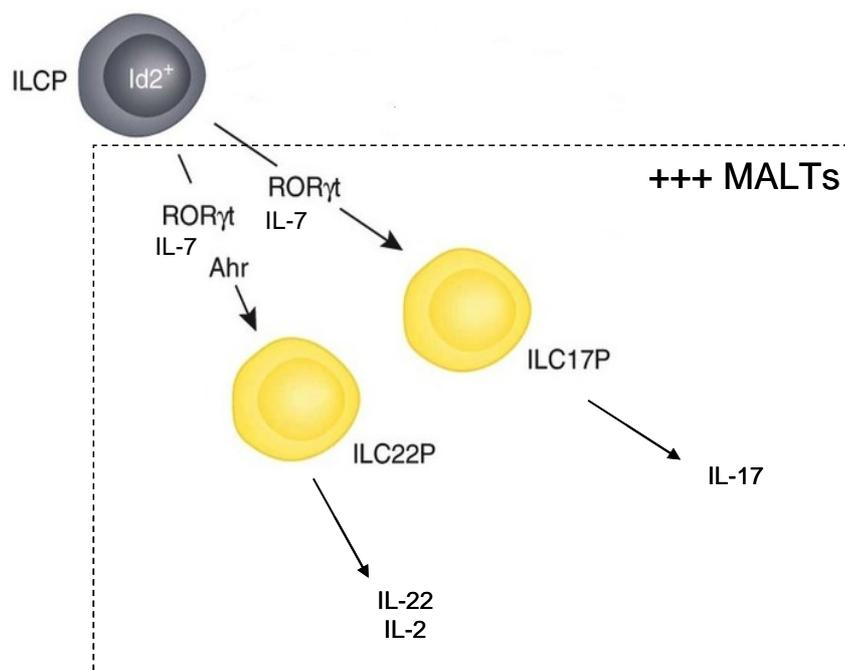


Figure 13: Différenciation des cellules lymphoïdes innées (ILCs) et sécrétions associées (d'après Spits and Di Santa, 2010)

Chez l'homme comme chez la souris, **les ILC22** sont retrouvées principalement au niveau des muqueuses (*lamina propria* de l'intestin, amydales) et expriment le marqueur NKp46 (Monticelli et al., 2012). Chez la souris, Satoh-Takayam et al. (2009) ont montré une action protectrice de l'IL-22, vis-à-vis du pathogène *Citrobacter rodentium*, produite par les

ILC22 (Satoh-Takayama et al., 2009; Satoh-Takayama et al., 2008). Les ILC22 humaines sont productrices de forte concentration d'IL-2 suggérant que ces cellules sont impliquées dans le recrutement et la survie des Tregs et des cellules T effectrices (Spits and Di Santo, 2010).

Les ILC17 sont principalement présentes dans le tractus intestinal et expriment le facteur de transcription ROR γ t nécessaire pour leur développement et la mise en place de leur fonction (Buonocore et al., 2010). Elles sont caractérisées par l'absence des marqueurs CD4 et NKp46 ce qui les distingue des LTI (CD4⁺) et des ILC22 (NKp46⁺). L'IL-17 produit par les ILC17 dans des conditions inflammatoires est régulée par l'IL-23.

Les ILCs apparaissent comme un nouveau type cellulaire intervenant très tôt dans les réponses immunitaires en réponse aux infections. Elles sont le miroir des sous-populations de cellules Th et peuvent orchestrer rapidement les réponses immunitaires au niveau local que ce soit respiratoire ou digestif.

3.4.2. Les lymphocytes T gamma-delta (LT γ δ)

Les lymphocytes T γ δ représentent un type de lymphocytes T particulièrement minoritaire dans le sang circulant (<10 % des lymphocytes T) chez l'homme et la souris. Ils sont nettement plus abondant chez d'autres espèces comme le porc où ce type lymphocyte peut représenter jusqu'à 30% du nombre de lymphocytes du sang circulant (Stepanova et al., 2007). On retrouve les lymphocytes T γ δ essentiellement dans les tissus, la peau et les muqueuses, spécialement au niveau intestinal où elles peuvent représenter plus de 50% des lymphocytes intra-épithéliaux (Sutton et al., 2012). Ils ne reconnaissent pas des épitopes classiques mais plutôt des épitopes conservés au sein des pathogènes. Pour ces raisons, les LT γ δ sont considérés comme des cellules appartenant à l'immunité innée éliminant les pathogènes et produisant des molécules anti-virales.

Les cellules T γ δ expriment de nombreux récepteurs aux cytokines et chémokines lesquels sont impliqués dans l'activation de ces cellules et la production d'IL-17. Les cellules T γ δ sont une importante source d'IL-17 (Roark et al., 2008). Ainsi, l'IL-1, IL-6, IL-18 et IL-23 sont impliqués dans la mise en place de la production d'IL-17 par les cellules T γ δ . En effet, l'IL-1 α ou IL-1 β , en synergie avec IL-23, ont un rôle essentiel dans l'induction de la production de l'IL-17 par les cellules T γ δ (Caccamo et al., ; Casteels et al., 1998; Ma et al., 2011; Sutton et al., 2009). D'autre part, chez des animaux déficients en IL-21, les cellules T γ δ

de la *lamina propria* et de la rate montre une expression en IL-17 augmentée d'un facteur 10 comparée aux souris sauvages, indiquant aussi un rôle majeur de l'IL-21 dans la différenciation des cellules T $\gamma\delta$ productrices d'IL-17 (Nurieva et al., 2007).

Les cellules T $\gamma\delta$ productrices d'IL-17 constituent l'une des deux sous-populations de cellules T $\gamma\delta$ (l'autre étant productrice d'IFN- γ) et possèdent différentes fonctions : production de cytokines ou d'immunoglobulines, fonction de cytotoxicité ou immunorégulatrices. Ces thymocytes peuvent être différenciés en T $\gamma\delta$ producteurs d'IFN- γ ou d'IL-17 par l'expression du marqueur CD27 (Ribot et al., 2009). En effet, le CD27 est requis pour le développement des cellules T $\gamma\delta$ producteur d'IFN- γ et expriment t-bet (facteur de transcription des Th1) alors que les cellules CD27⁻ T $\gamma\delta$ expriment ROR γ t (facteur de transcription de la lignée Th17) (Ribot et al., 2009). Il est à noter que le facteur de transcription PU.1 a été également montré comme régulant négativement la prolifération et la production d'IL-17 par les cellules T $\gamma\delta$ (Lochner et al., 2008). D'autres récepteurs de surface que le CD27 sont associés aux cellules T $\gamma\delta$ productrices d'IL-17 incluant le CD127 (IL-7R) et CCR6 (Dirix et al., 2009).

Ainsi les cellules T $\gamma\delta$ peuvent être, dans certaines situations, la population sécrétrice d'IL-17 prédominante. Par exemple, dans le cas d'une infection par *Mycobacterium tuberculosis*, parmi les cellules T isolées des poumons, les cellules T $\gamma\delta$ correspondaient aux cellules produisant de fortes concentrations l'IL-17 (Sutton et al., 2012).

3.4.3. Les lymphocytes T invariants natural killer (iNKT)

Les iNKT productrices d'IL-17 sont présentes dans les poumons constituant plus de 40% des cellules iNKT pulmonaires dans le modèle souris. Ces cellules, de la même façon que les cellules T $\gamma\delta$, sont également présentes dans les nœuds lymphatiques et la peau (Sutton et al., 2012). Leur stimulation est également induite par l'IL-1 β et l'IL-23 (Doisne et al., 2011). Cependant à l'inverse des cellules Th17, l'IL-6 ne semble pas être requise pour la production d'IL-17 par les T $\gamma\delta$ et les iNKT (Rachitskaya et al., 2008; Sutton et al., 2009). Les iNKT sont caractérisés par l'expression du récepteur restreinte au TCR qui reconnaît les antigènes glycolipides présentés par la molécule CD1d exprimée par les CPA (Kronenberg and Gapin, 2002). Ces cellules produisent des cytokines de la réponse Th1 et Th2, et également de l'IL-17 montrant leur implication dans la protection de l'hôte contre les

infections quelles soient bactérienne, fongique ou même virale. En 2012, une étude a identifié un nouveau marqueur des cellules IL-17⁺ iNKT : l'IL-17RB, montrant leur rôle dans certaines pathologies virales telles que le virus respiratoire syncytial (VRS) (Watarai et al., 2012).

Les lymphocytes T CD8⁺ peuvent également produire de l'IL-17 (Tc IL-17). Ces cellules partagent les mêmes pré-requis que les Th17 pour leur développement (Ciric et al., 2009; Huber et al., 2009). Cependant, leur rôle physiologique n'a pas été encore clarifié à ce jour.

3.5. Pathologies associées à la balance IL-17/Tregs

Les cytokines IL-17 et IL-23 ont été mises en cause dans les maladies auto-immunes telles que : la sclérose en plaque appelé EAE dans le modèle expérimental murin et la polyarthrite rhumatoïde, dans le psoriasis, les allergies respiratoires (asthme) et les maladies inflammatoires intestinales (Crohn et colites ulcéraives) (Figure 14).

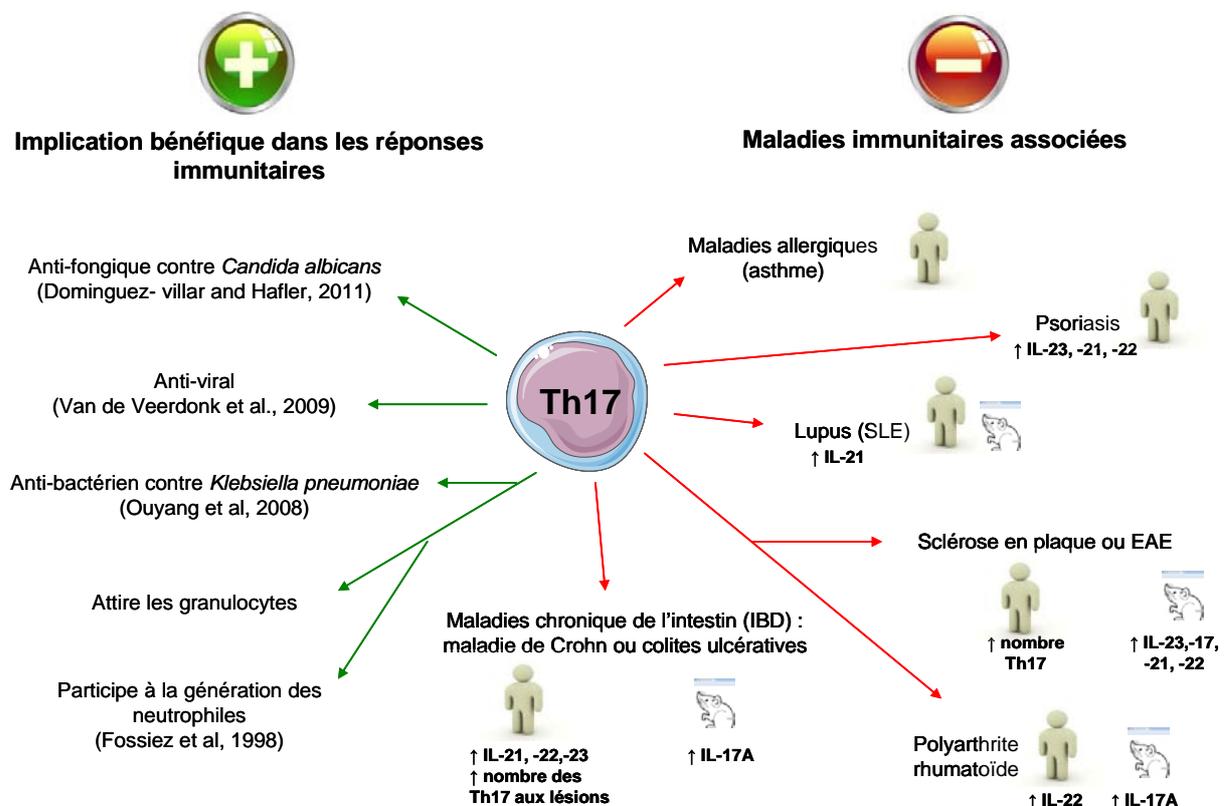


Figure 14: Les cellules Th17 et leurs implications dans les réponses immunitaires

Une tolérance au niveau des voies respiratoires est nécessaire pour éviter le développement de désordres allergiques aboutissant, par exemple, à l'asthme. Il existe différents types d'asthme incluant l'asthme allergique mais également l'asthme induit par l'exposition aux polluants de l'air ou à la fumée de cigarette (Kim et al., 2010). **L'asthme** est dominé par une expansion pathologique des cellules Th2 et Th17. En effet, les sécrétions produites par les lymphocytes Th2 et les Th17 induisent le recrutement des neutrophiles et des éosinophiles et favorisent les productions de multiples cytokines pro-inflammatoires et d'IgE (Andreev et al., 2012). Le TGF- β est sur-exprimé dans les cas de crises d'asthme initiant ainsi la différenciation des cellules T naïves en Th17. L'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, voit son expression réduite chez les sujets asthmatiques, associée à un manque de cellules Tregs. Ainsi, outre une activation de la voie Th2 et de la production des IgE, l'asthme est également provoqué par un défaut d'homéostasie immunitaire inflammatoire entre les populations Th17 et Tregs au niveau pulmonaire (Andreev et al., 2012).

Certaines études indiquent que les maladies pulmonaires sont fréquemment liées aux **maladies inflammatoires intestinales (IBD)** (Black et al., 2007; Turner-Warwick, 1968). En 2012, Keely et ses collègues suggèrent un dialogue poumon-intestin au sein des maladies inflammatoires des muqueuses montrant un lien entre maladies inflammatoires affectant les poumons et l'intestin (Keely et al., 2012).

Aujourd'hui, la prévalence des IBD augmente en Europe et aux Etats-Unis (Baumgart and Carding, 2007). Les deux formes majeures d'IBD sont **la maladie de Crohn (CD)** et **la colite ulcéreuse (UC)**. Elles sont caractérisées par une inflammation chronique au niveau intestinal résultant de prédispositions génétiques. Le déclenchement de ce type de pathologie survient à la suite d'une exposition à un certain nombre de facteurs environnementaux. Par exemple, deux facteurs ont un rôle établi dans la maladie de Crohn : le tabac et l'appendicectomie. De nombreux autres facteurs environnementaux font l'objet de recherche tel que les micro-organismes infectieux, les contaminants alimentaires, les traitements médicamenteux, le stress ou d'autres facteurs socio-économiques. Ces différents facteurs peuvent altérer la balance immunitaire inflammatoire intestinale dont les acteurs principaux sont les cellules Th17 et Tregs (Pandolfi et al., 2009). Ainsi, l'axe IL-17/IL-23 est généralement associé aux IBD. Les patients souffrants d'IBD présentent une accumulation intracellulaire d'IL-17 au niveau de la muqueuse intestinale (Fujino et al., 2003). De plus, les malades atteints de la CD voient leur population de cellules Th17 ou Th1/Th17 productrices d'IL-17 augmentée dans l'intestin

(Annunziato et al., 2007). Cependant, bien que l'axe IL-17/IL-23 soit prédominant dans le développement des IBD, l'IL-22 est également surexprimée chez ces patients (Crome et al., 2009).

3.6. Les lymphocytes T régulateurs (Tregs)

Au début des années 1970, Gershon and Kondo établissent le concept de cellules T suppressives impliquées dans les phénomènes de maintien de la tolérance (Gershon and Kondo, 1970). Aujourd'hui, de nombreuses études ont mis en évidence l'engagement de cette population de cellules T dans le maintien et la régulation de la réponse immunitaire, dans la tolérance, et dans le contrôle des cellules T auto-réactives et des maladies auto-immunes ou allergiques, la surveillance des cancers ou encore leur importance dans le non-rejet des transplantations d'organes (Pandolfi et al., 2009). Chez l'Homme, une déficience en cellules T suppressives est responsable du développement de pathologies infectieuses et/ou inflammatoires (Taams et al., 2006). D'origine thymique, leur action majeure consiste à inhiber la réponse immunitaire. Dans ce but, elles ont la capacité de limiter la production d'anticorps par les lymphocytes B et/ou de supprimer l'activation et l'expansion des cellules T effectrices (Th1, Th2 et Th17) (Sakaguchi, 2000; Shevach, 2000). En effet, elles peuvent limiter l'interaction des Th effectrices avec les DCs, moduler les fonctions des CPA ou encore agir directement sur les cellules T effectrices en les tuant ou en les inhibant (Figure 15). Ces modes d'action seront repris de façon plus détaillée dans le paragraphe 3.6.2.

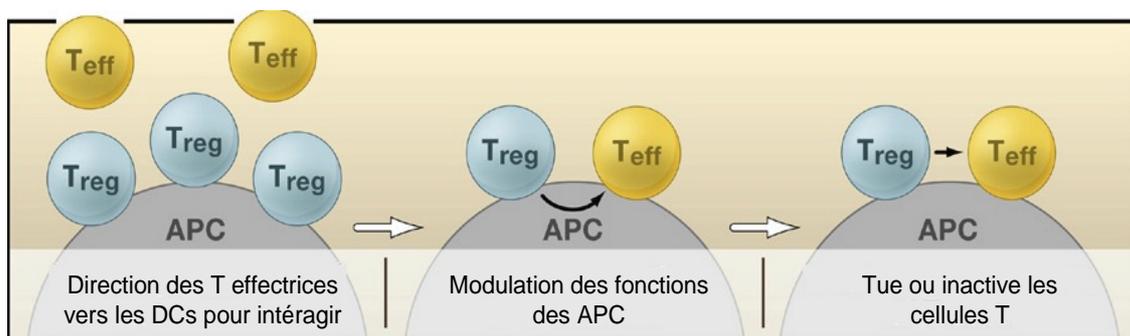


Figure 15: Actions des LT régulateurs face à l'induction des réponses T effectrices

Elles sont prépondérantes au sein des muqueuses notamment intestinales. Au niveau du colon, les cellules Tregs peuvent représenter plus de 40 à 50 % des cellules T CD4⁺ (Goto and

Ivanov, 2013). Cependant, on les retrouve de façon ubiquitaire dans l'ensemble de l'organisme (homme ou souris) où elles représentent entre 5 à 10 % des cellules T périphériques (Jonuleit et al., 2001). L'existence des Tregs a été montré chez de nombreuses espèces (Garden et al., 2010). Notamment, Käser et al., en 2008 révèlent la présence de Tregs dans le sang, la rate, les nœuds lymphatiques et le thymus chez le porc (Kaser et al., 2008a).

3.6.1. Ontologie et phénotype des sous-populations de Tregs

Il existe deux types de Tregs : les T régulatrices naturelles (nTregs) qui se développent dans le thymus à partir de progéniteurs lymphoïdes et les cellules T régulatrices induites (iTregs) qui se différencient en périphérie à partir de cellules T CD4⁺ naïves ou de lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (CTL) (Mills, 2004; Peterson, 2012; Workman et al., 2009). Chez la souris, le suivi de l'expression du forkhead box protein 3 (FoxP3), marqueur spécifique des Tregs, a permis de montrer que les cellules FoxP3⁺ étaient retrouvées uniquement dans la medulla thymique où se déroule les dernières étapes de sélection positive et négative des lymphocytes T, suggérant que le développement des Tregs se produit relativement tardivement dans le thymus (Fontenot et al., 2005) (Figure 16).

cellules endothéliales des artères pulmonaires. Selon l'expression des intégrines à la surface des nTregs, Jonueit et Schmitt (2003) décrivent l'existence de deux types de nTregs de phénotype différent. Les nTregs exprimant l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ ont la capacité de convertir des cellules T $CD4^+$ naïves en Tregs induites de type 1 (Tr1) via la production d'IL-10 alors que les nTregs exprimant l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ vont générer préférentiellement des Tregs induites helper 3 (Th3) via la production de TGF- β (Jonuleit and Schmitt, 2003). Cependant, cette fonction de différenciation des cellules T $CD4$ naïves en Tregs ne remplace pas leur fonction principale de cellules suppressives des cellules T effectrices.

Le marqueur le plus spécifique des Tregs est le **FoxP3 (forkhead box protein 3)**. Il est exprimé par toutes les sous-populations de Tregs sauf les Tr1. FoxP3 est un facteur de transcription qui semble essentiel, mais pas indispensable pour le développement et le fonctionnement des Tregs. Chez l'Homme, comme chez la souris, une mutation du gène FoxP3 induit le syndrome lié au chromosome X appelé **syndrome IPEX** (Immuno-dérégulation Poly-endocrinopathie Entéropathie auto-immune lié au chromosome X) qui est une maladie rare associant un déficit immunitaire, une poly-endocrinopathie et une entéropathie (Gambineri et al., 2003).

En 2006, Liu et al. mettent en évidence une corrélation entre l'expression du récepteur à l'IL-7 (CD127) et du facteur de transcription FoxP3 à la surface des cellules T $CD4^+$ humaines (Liu et al., 2006). L'expression des molécules de co-stimulation, récepteurs à cytokines et chémokines à la surface de ces cellules est décrit chez l'Homme (Tableau 6).

Sous-population de Tregs Phénotype	Tregs naturelles	Tregs induites			Tregs mémoires
		T CD4 ⁺ naïves		T CD8 ⁺	
		Tr1	Th3	iCD8 ⁺ Tregs	
Homme	<p><u>Marqueurs de surface</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • IL-2R(α) = CD25⁺, CD4⁺, CD8⁻ <p><u>Molécules de costimulation / activation</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • TCRαβ⁺, CD80/86⁺, CD28⁺, CD40⁺/CD40L⁺, CTLA-4⁺, LAG-3⁺, CD39⁺, CD73⁺ <p><u>Intégrines et récepteurs aux chémokines</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • α4β7⁺, α4β1⁺, CCR9⁺ <p><u>Marqueur spécifique des Tregs</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • FoxP3⁺ <p><u>Récepteur de cytokines/ cytokines</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • IL-7R = CD127^{low}, IL-10^{high}, TGF-β⁺ 	<p>CD25⁺, CD4⁺, CD8⁻</p> <p>TCRαβ⁺, CD80/86⁺, CD28⁺, CD62L⁺, CD40⁺/CD40L⁺, CTLA-4⁺, LAG-3⁺</p> <p>CCR3⁺ CCR4⁺ CCR5⁺ CCR8⁺</p> <p>FoxP3⁻</p> <p>IL-10^{high}, TGF-β^{high} IL-15^{int} IFN-γ^{low}, IL-2^{low} IL-4⁻</p>	<p>CD25⁺, CD4⁺, CD8⁻</p> <p>TCRαβ⁺, CD80/86⁺, CD28⁺, CD62L⁺, CD40⁺/CD40L⁺, CTLA-4⁺, LAG-3⁺</p> <p>α4β7⁺, CCR9⁺</p> <p>FoxP3⁺</p> <p>IL-10^{high}, TGF-β^{high}</p>	<p>CD25⁺, IL-2R(β) = CD122⁺, CD4⁻, CD8⁺</p> <p>TCRαβ⁺, CD80/86⁺, CD28^{+/-}, CD40⁺/CD40L⁺, CTLA-4⁺, LAG-3⁺</p> <p>CD103⁺</p> <p>FoxP3⁺</p> <p>IL-10^{high}, TGF-β^{high} IFN-γ⁺</p>	<p>CD25⁺, CD4⁺, CD8⁺</p> <p>TCRαβ⁺, CD80/86⁺, CD28^{+/-}, CD40⁺/CD40L⁺, CTLA-4⁺, LAG-3⁺</p> <p>CCR7^{+/-}</p> <p>FoxP3⁺</p> <p>IL-10^{high}, TGF-β^{high} IFN-γ⁺</p>

Tableau 6 : Phénotype des différentes sous-populations de Tregs chez l'Homme

Cependant, le développement des nTregs ne dépend pas exclusivement de la présence du FoxP3 mais également de la présence des molécules de costimulation/activation et de l'environnement cytokinique. Comme la plupart des lymphocytes T, l'IL-2 est également un facteur de survie pour les Tregs. En effet, il est largement décrit dans la littérature que la présence d'IL-2 est un élément critique au développement et à la survie des nTregs (Malek et al., 2008). Sakaguchi et al., 2008 ont montré qu'une exposition simultanée des cellules T CD4⁺ naïves à l'IL-2 et au TGF-β permet une différenciation en nTregs (Sakaguchi et al., 2008). Impliqué dans la différenciation des T CD4⁺ naïves, le TGF-β serait également important dans le maintien de l'expression de FoxP3 (Marie et al., 2005). Cependant, le rôle de cette cytokine reste encore très controversé et son implication dans la différenciation des nTregs encore à définir (Wan and Flavell, 2007).

Localisé dans la medulla thymique chez l'Homme, il existe un type particulier de cellules épithéliales appelées les corpuscules de Hassall impliqués dans la différenciation des cellules thymiques CD4⁺ en nTregs. Ces cellules ont la capacité d'orienter la différenciation

des cellules naïves T CD4⁺ en exprimant le thymic stromal lymphopoietin (TSLP) influençant l'expression des molécules CD80/CD86 à la surface des cellules dendritiques (DCs) thymiques, elles-mêmes étant à l'origine de la différenciation des cellules thymiques CD4⁺ en nTregs (Watanabe et al., 2005).

3.6.1.2. Les cellules T régulatrices inductibles (iTregs)

A l'inverse des nTregs qui se différencient dans le thymus, **les iTregs** se différencient en périphérie à partir de cellules naïves T CD4⁺ ou à partir de cellules T cytotoxiques CD8⁺ (CTL) (Mills, 2004). En fonction de leur environnement cytokinique, on distingue plusieurs types de cellules Tregs inductibles. A partir des cellules naïves T CD4⁺, on répertorie deux types d'iTregs : **les cellules T régulatrices de type 1 (Tr1)** et **les cellules T helper 3 (Th3)** respectivement induites par la présence d'IL-10 ou de TGF-β. Les cellules T CD8⁺, se différencient quant à elle, en **cellules T régulatrices CD8⁺ inductibles (iCD8⁺Tregs)** en présence d'IFN-γ. Ces différentes sous-populations sont également décrites dans le modèle porcin en 2008 par Käser et ses collègues montrant la présence de cellules co-exprimant les marqueurs FoxP3/CD4 ou FoxP3/CD8 (Kaser et al., 2008a).

La différenciation des cellules T CD4⁺ ou T CD8⁺ périphériques en iTregs ne dépend pas exclusivement de l'environnement cytokinique. Elle est également dépendante de nombreux autres facteurs tels que la voie d'exposition (intra-nasale vs orale), de la présence de diverses micro-organismes ou du type de cellules présentatrices de l'antigène (APC) telles que les DCs ou les macrophages (Coombes et al., 2007). En effet, il a été montré par de nombreuses équipes, l'importance de la présence des DCs au sein du GALT dans la formation des iTregs (Coombes et al., 2007; Sun et al., 2007; Wakkach et al., 2003) ou encore l'implication des macrophages de la *lamina propria* (CD11b⁺F4/80⁺CD11c⁻) dans l'induction des Tregs FoxP3⁺ en présence d'acide rétinoïque (RA), de TGF-β et d'IL-10 (Denning et al., 2007).

3.6.1.2.1. Les cellules T régulatrices inductibles CD4⁺ : Tr1 et Th3

Les cellules Tr1

Leur spécificité vient du fait qu'elles n'expriment pas le FoxP3. Elles ont généralement le phénotype : CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ (Battaglia et al., 2006; Vieira et al., 2004). Les

Tr1 expriment les marqueurs classiques d'activation incluant le CD28, CD40/CD40L, TCR $\alpha\beta$, CTLA-4 ou LAG-3 et des récepteurs aux chémokines tels que CCR3, CCR4, CCR5 et CCR8 (Roncarolo et al., 2006; Sebastiani et al., 2001). L'équipe de Groux et al. (1997) a montré que des cellules T CD4⁺ à fonction régulatrice peuvent être générées chez l'Homme et la souris par stimulation répétée *in vitro* en présence de l'antigène (OVA) et d'IL-10 (Groux et al., 1997). Les clones obtenus ont été dénommés Tr1 à cause de leur phénotype (distinct des cellules Th1 ou Th2) et caractérisé par leur production élevée d'IL-10, d'IL-15 et d'un faible taux de TGF- β . Elles produisent également de faibles quantités d'IL-2 et d'interféron gamma (IFN- γ), des quantités intermédiaires d'IL-5 et ne produisent pas d'IL-4. La fonction suppressive des cellules Tr1 vis-à-vis de réponses Th1 et Th2 a été mise en évidence *in vivo* et *in vitro*. Les clones Tr1 sont notamment capables d'inhiber *in vivo* le développement de pathologies médiées par les cellules Th2, puisqu'elles suppriment, via la production d'IL-10, la réponse IgE sérique et la prolifération de cellules CD4⁺ effectrices dans un modèle d'hypersensibilité immédiate à l'OVA (Cottrez et al., 2000). Il a aussi été montré que les DCs jouent un rôle clé dans la génération de cellules Tr1. L'état de maturation des DCs semble être important mais est encore mal défini. Ainsi, il a été initialement montré que la stimulation répétée *in vitro* de lymphocytes T CD4⁺ par des DCs immatures conduit à l'émergence de cellules Tr1 régulatrices (Jonuleit et al., 2000). En revanche, des études *in vivo* ont montré que la tolérance induite par l'administration intra-nasale de l'antigène est dépendante de l'induction de Tr1 initiée elle-même par l'IL-10 produit par les DCs matures pulmonaires (Akbari et al., 2001).

Les cellules Th3

Comme les cellules Tr1, **les cellules Th3** produisent elles aussi une forte concentration d'IL-10. En revanche à l'inverse des Tr1, elles sécrètent du TGF- β à des niveaux plus conséquents et elles expriment le FoxP3. Leur profil phénotypique est très proche des nTregs. Montré aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* dans des modèles humains ou murins, et contrairement aux nTregs, la présence de TGF- β est un facteur prédominant dans la différenciation des cellules T CD4⁺ naïves en iTregs Th3 (Apostolou and von Boehmer, 2004; Chen et al., 2003). Une étude a montré que ces cellules sont capables d'inhiber *in vitro* la prolifération et la production de cytokines des cellules Th1 spécifiques de l'antigène. Leur

profil de production de cytokines est distinct des cellules Th2 et est caractérisé par la sécrétion de quantités élevées de TGF- β . Même si les mécanismes permettant l'induction des cellules CD4⁺ régulatrices de type Th3 au niveau du GALT, sont mal connus, leur différenciation *in vitro* semble être favorisée par l'IL-10, l'IL-4 et le TGF- β (Seder et al., 1998). Le rôle des Th3 semble donc particulièrement important au niveau tissu intestinal. Ces cellules interviennent principalement dans le maintien de la tolérance. L'intestin est donc un site privilégié dans la différenciation en iTregs. Au sein de cette muqueuse, de nombreuses cellules ont la capacité de sécréter du TGF- β induisant la sur-expression de l'intégrine αE (= CD103) $\beta 7$ présent à la surface des DCs CD103⁺. Ces DCs CD103⁺($\alpha E\beta 7$) sont capables de produire de large quantité **d'acide rétinoïque (RA)** indispensable à la différenciation des T CD4⁺ naïves en iTregs (Coombes et al., 2007). Le RA est un précurseur de la vitamine A. Le RA est considéré comme facteur inducteur des Tregs et est impliqué dans le maintien de l'homéostasie immunitaire intestinale. Ainsi, un déficit en RA induit une exacerbation de l'EAE chez les souris. De plus, de nouvelles données suggèrent qu'un défaut dans la fonctionnalité des Tregs pourrait être à l'origine des IBD (Himmel et al., 2008).

3.6.1.2.2. Les cellules T régulatrices inductibles CD8⁺ : iCD8⁺Tregs

Les cellules iCD8⁺Tregs aussi appelées **Tc regs (T régulatrices cytotoxiques)** (Li et al., 2011) se différencient en périphérie à partir de CTL en présence d'IFN- γ . Au sein du thymus comme dans les organes lymphoïdes périphériques, les iCD8⁺Tregs représentent moins d'1% des cellules T CD8⁺ qui pour 40% d'entre elles sont des lymphocytes intestinaux (Smith and Kumar, 2008). Leur identification est difficile du fait du manque de marqueur spécifique présent à leur surface. Cette population est caractérisée par le phénotype suivant : CD8⁺CD4⁻FoxP3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺. Chez les rongeurs comme chez l'Homme, les cellules iCD8⁺Tregs présentent les marqueurs caractéristiques des cellules T activées comme le CD122 (chaîne β du récepteur à l'IL-2), le CD25, l'intégrine CD103 et le CD28 (Gol-Ara et al., 2012; Uss et al., 2006).

La différenciation des CTL en iCD8⁺Tregs semble nécessiter la présence d'IL-2 et d'IFN- γ . L'IFN- γ étant sécrété majoritairement par les Tr1, il semble que ces cellules soient essentielles au développement et à l'induction des iCD8⁺Tregs.

Le rôle régulateur des cellules Treg CD8⁺ *in vivo* a pu être mis en évidence dans le modèle de l'EAE, par transfert adoptif de la tolérance par des cellules T CD8⁺ (Chen et al., 1995). Par ailleurs, des cellules T CD8⁺ isolées de souris tolérisées sont capables d'inhiber *in vitro* la prolifération et la production d'anticorps spécifiques (Lider et al., 1989). En revanche, des souris déplétées en cellules T CD8⁺ par injection d'anticorps anti-CD8 présentent une tolérance orale normale dans le modèle d'EAE (Chen et al., 1995) ou dans le modèle de tolérance à l'OVA (Garside et al., 1995). La contribution des cellules T CD8⁺ dans l'établissement de la tolérance orale reste encore à clarifier.

Leur dysfonctionnement chez l'Homme entraîne des maladies auto-immunes incluant les maladies inflammatoires de l'intestin et des scléroses multiples (Brimnes et al., 2005; Faunce et al., 2004; Joosten and Ottenhoff, 2008; Tennakoon et al., 2006).

3.6.1.3. Les cellules T régulatrices mémoires (mTregs)

Les lymphocytes T mémoires sont circulants dans la lymphe, les ganglions lymphatiques, le sang et la rate. Leur seuil d'activation est plus faible comparé aux lymphocytes T naïfs ce qui rend la réponse mémoire plus rapide et efficace permettant une élimination du pathogène lors d'une ré-exposition. Les cellules T régulatrices mémoires co-exprimant le CD4 et le CD8 ont été reportées chez l'Homme mais également chez différentes espèces animales (Nascimbeni et al., 2004). Cette population de lymphocytes est non-conventionnelle et rare (<5%), cependant leur nombre augmente considérablement lors d'une réinfection. Sanchez et ses collaborateurs, en 2012 ont pu montrer l'existence d'une population de Tregs spécifiques de l'antigène qui pouvait être activée et être amplifiée lors d'une infection virale *in vivo*. Comme les cellules T CD4⁺ non-régulatrices, les cellules T activées subissent une conversion sous la forme de cellules mémoires après résolution de l'épisode infectieux. Dans cette étude, ils mettent également en évidence la capacité de ces cellules Tregs mémoires à proliférer, sécréter de forte concentration d'IL-10, réparer les dommages tissulaires et supprimer l'inflammation induite par les cellules T mémoires non régulatrices (Sanchez et al., 2012). Les cellules Tregs mémoires FoxP3⁺TCRαβ⁺ sécrètent de l'IL-10 et de l'IFN-γ.

inflammatoire dans l'intestin (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009). Les Tr1 et les Th3 sont particulièrement importants au niveau du tissu intestinal. Ces cellules interviennent principalement dans le maintien de la tolérance notamment vis-à-vis des bactéries commensales. Les iCD8⁺Tregs ont un rôle dans la régulation de l'alloréactivité, des transplantations et de l'autoimmunité (Smith and Kumar, 2008). Les Tregs mémoires quant à elles ont un rôle majoritaire dans la suppression de l'inflammation induite par les cellules T mémoires non-régulatrices lors d'une ré-exposition à un élément étranger.

Chacune de ces populations de Tregs agissent sur différentes cibles. Les nTregs ont un rôle pivot dans les effets immunosuppresseurs contre les cellules T CD8⁺, les cellules Th1 et les cellules NK (Marie et al., 2005). Les Tr1 et les Th3 agissent sur l'ensemble des cellules T effectrices (Th1, Th2, Th17, CTL, cellules NK), via l'action de leurs sécrétions cytokiniques (Peterson, 2012). Les iCD8⁺Tregs ciblent les cellules T activées (Smith and Kumar, 2008). Il est important de noter que les iCD8⁺Tregs doivent être activées avant de pouvoir réguler l'activité des autres cellules T effectrices. Cette activation peut être accomplie après stimulation du TCR initiée par l'association peptide/récepteur spécifique telle que les PRRs présentés par les APCs (Kumar, 2004).

Les capacités de suppression des cellules Tregs peuvent être regroupées en trois voies principales : 1/ la production de facteurs solubles suppressifs, via un effet local visant à établir une compétition pour les différents facteurs de croissance ou via des mécanismes dépendant d'un contact cellulaire; 2/ elles peuvent agir également directement sur les cellules T effectrices et/ou sur les APCs et 3/ via des facteurs solubles pouvant directement supprimer les effets des cellules T effectrices (Figure 17) .

Ce mécanisme impliquant les facteurs solubles IL-10, IL-35 et TGF- β vont agir directement sur les cellules T effectrices pour supprimer leurs effets. Un autre facteur soluble produit par les Tregs appelé la protéine de fibrogène de type 2 (FLG-2) possède un effet apoptotique sur les populations T effectrices (Shalev et al., 2009). Les facteurs solubles constituant le système perforine/granzyme A et B sont également connus pour initier un effet apoptotique sur ces cellules (Grossman and Ley, 2004).

Le second mécanisme d'action utilisé par les Tregs pour supprimer l'action des T effectrices consiste à établir une compétition pour les facteurs de croissance et notamment pour l'IL-2 induisant ainsi à l'apoptose des cellules cibles (Vignali et al., 2008).

Enfin, le dernier mécanisme d'action utilisé par les Tregs pour limiter les effets des cellules T effectrices fait intervenir les contacts cellulaires. Ainsi, la galectine-1 est une protéine surexprimée par les Tregs. L'interaction entre la galectine-1 et son récepteur présent sur les cellules T effectrices induit l'apoptose des cellules T effectrices (Garin et al., 2007). Les Tregs peuvent supprimer les effets de leurs cellules cibles via les APCs. En effet, l'interaction des molécules de surface exprimée par les Tregs comme CTLA-4 et le gène d'activation des lymphocytes (LAG-3) avec leur récepteur respectivement le CD80/86 et le MHCII présent à la surface des APCs réduit la capacité des APCs à activer les cellules T effectrices (Peterson, 2012; Vignali et al., 2008; Workman et al., 2009). De plus, il a été mis en évidence que les Tregs pouvaient être à l'origine de la production d'une enzyme immunorégulatrice dégradant le tryptophane par les DCs, l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) capable d'inhiber la prolifération lymphocytaire (Mellor and Munn, 2004).

C. Les cellules Th1/Th17/Tregs : Acteurs clés de la balance immunitaire régulant l'homéostasie

L'activation des cellules Th1/Th17 ou Tregs doit être régulée de telle façon que l'organisme puisse se défendre contre tous agents pouvant perturber cette homéostasie (agents microbiens ou xénobiotiques) et permettre une tolérance immunitaire inflammatoire à bas bruit en réponse à des antigènes du soi ou à des bactéries commensales et ainsi empêcher une réaction inflammatoire excessive qui serait nocive pour l'hôte.

Les cellules **Th1** produisant de l'**IFN- γ** , de l'**IL-12**, de l'IL-2 et du TGF- β interviennent majoritairement dans l'immunité cellulaire notamment dans l'élimination des bactéries phagocytées et la prolifération des lymphocytes T. En effet, l'IFN- γ va activer les macrophages qui vont phagocyter des bactéries et ainsi initier l'inflammation. Récemment, il a été mis en évidence que l'IL-12 produit par les cellules Th1 joue un rôle important dans la pathogénèse des IBD et notamment dans la maladie de Crohn (Neurath et al., 2002). Tout comme les cellules Th1, les cellules Th17 sont également impliquées dans la pathogénèse de la maladie de Crohn.

Alors que celles-ci sont connues pour induire une forte réponse inflammatoire (cf : paragraphe 3.2), les cellules Tregs ont pour rôle de limiter cette inflammation en sécrétant

des molécules anti-inflammatoires (cf : paragraphe 3.6). Cependant, leur différenciation respective reste interconnectée. En effet, elles partagent un facteur de différenciation commun : le TGF- β . Ainsi, un lymphocyte Th naïf peut devenir une cellule Treg en présence de TGF- β et de l'activation parallèle du facteur de transcription spécifique des Tregs : FoxP3 (Chen et al., 2003). Cependant, la présence simultanée de TGF- β , d'IL-6 (Veldhoen et al., 2006a) ou d'IL-21 (Korn et al., 2007) et d'IL-23 inhibe la différenciation des cellules Th naïves en Tregs pour donner des Th17 parallèlement à l'activation de ROR- γ t, facteur de transcription des cellules Th17 (Ivanov et al., 2006).

La différenciation des cellules Th naïves en Th17 ou Tregs repose sur une délicate régulation essentiellement basée sur deux éléments : l'environnement cytokinique dans lequel se trouvent les cellules Th naïves (TGF- β , IL-1, IL-2, IL-6, IL-21, IL-23, IL-10 ou encore le RA) et l'activation des différents facteurs de transcription engagés dans les voies de différenciation en cellules Th17 (**RORs, STAT3, IRF-4 et Ahr**) (cf : paragraphe 3.2.1.2) ou en cellules Tregs (**FoxP3**) (cf : paragraphe 3.6) (Figure 18).

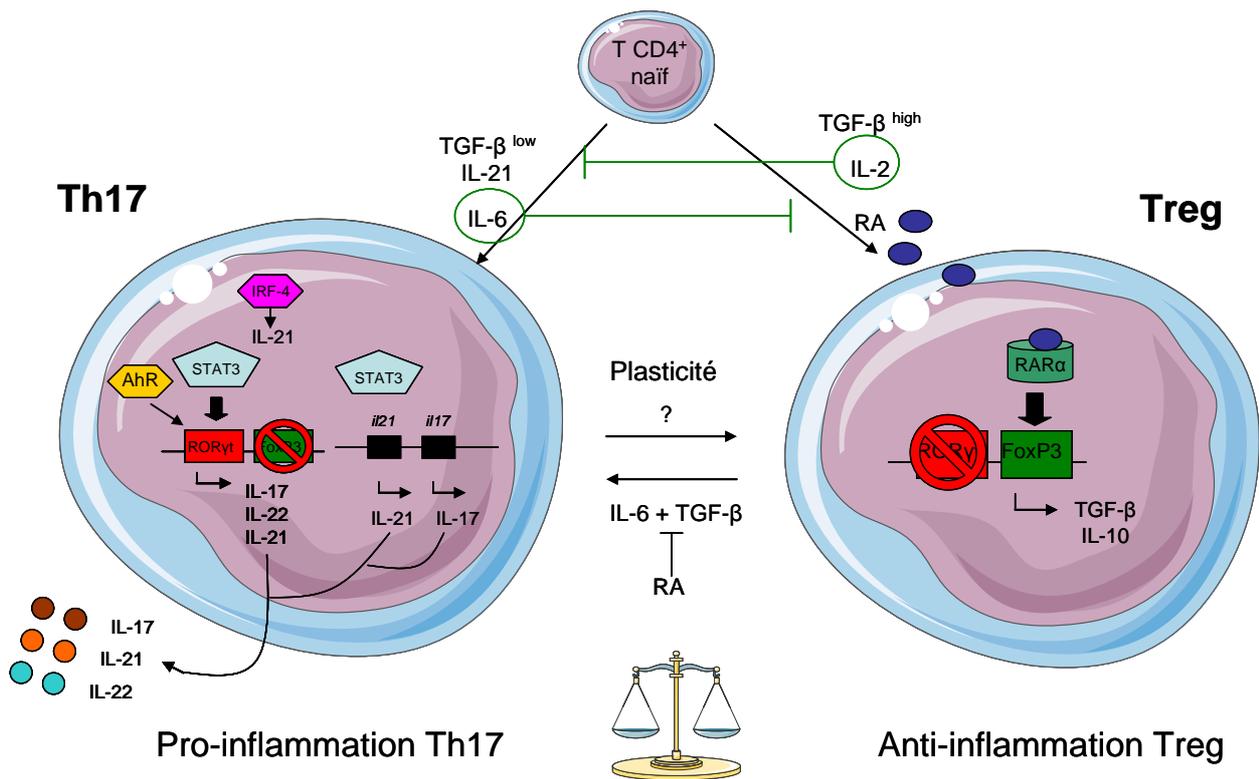


Figure 18: Balance inflammatoire Th17 – Tregs

Les cytokines et d'autres facteurs tels que le RA ont la capacité de réguler l'expression de ces facteurs de transcription. En effet, les cytokines IL-6 et IL-21 agissent sur le contrôle de la balance FoxP3/RORyt. IL-6 a une action inhibitrice sur la fonctionnalité des Tregs en empêchant la génération des iTregs conduisant à l'induction des Th17. A l'inverse, chez la souris une mutation du gène de l'**IL-2**, facteur de survie des Tregs entraîne une diminution drastique du nombre de Tregs et augmente la fréquence des cellules Th17 laissant supposer que l'IL-2 inhibe l'induction des Th17 pour promouvoir la génération des Tregs (Laurence et al., 2007). Un autre facteur intervient également dans cette plasticité phénotypique et fonctionnelle : l'**acide rétinoïque (RA)**. Celui-ci, comme l'IL-2, favorise le développement des Tregs et des Th17 (Mucida et al., 2007). La présence de RA supprime la surexpression d'IRF-4 et du récepteur à l'IL-23 induisant une diminution de la différenciation des Th17 (Xiao et al., 2008). De plus, *in vivo*, la liaison entre le RA et son récepteur nucléaire **RARα** induit l'activité du promoteur du gène FoxP3 (Kang et al., 2007). Ahr est un facteur de transcription partagé entre ces deux voies de différenciation. En effet, parmi les ligands

d'Ahr, le 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) peut induire une expression de FoxP3 et générer des Tregs alors que le 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) également connu pour être un ligand d'Ahr va promouvoir la différenciation des Th17 (Quintana et al., 2008; Veldhoen et al., 2008).

Récemment, Yang et al, 2008 ont montré, dans un modèle souris, qu'il existe **une plasticité possible** après leur différenciation, les cellules Th17 et cellules Tregs pouvant changer de phénotype et de fonction. Ainsi, *in vitro* une cellule iTreg peut être reprogrammée afin de présenter un phénotype de type Th17 sous l'influence de TGF- β et d'IL-6 après cinq jours de différenciation et produire alors de l'IL-17 (Yang et al., 2008). Cependant, en présence de RA, l'IL-6 ne suffit pas à induire la reprogrammation d'une iTreg en Th17. Cette ré-expression du programme Th17 dans les cellules T FoxP3⁺ se fait en deux étapes. La première étant une réduction de l'expression de FoxP3 et la seconde une activation de ROR γ t et ROR α provenant de l'inhibition générée par FoxP3 (Korn, 2009).

De plus, il est à noter que génétiquement les facteurs de transcription ROR γ t et ROR α sont physiquement associés avec le FoxP3 sur un même locus (Du et al., 2008). Cette association constitue la base moléculaire de la relation réciproque entre les cellules Th17 et Tregs.

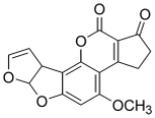
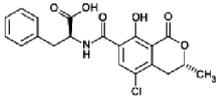
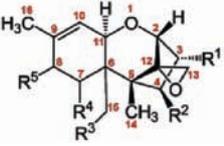
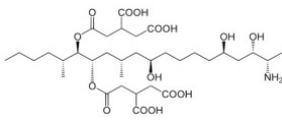
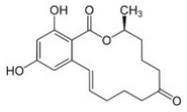
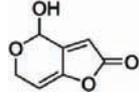
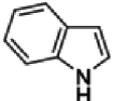
Chapitre 2 : Les mycotoxines

A. Généralités sur les mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires de diverse nature chimique synthétisées par des champignons filamenteux toxigènes appartenant principalement aux genres *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Fusarium spp.* et *Byssochlamys spp.* Les champignons produisant ces mycotoxines sont ubiquitaires. Ainsi, on les retrouve sur les plantes ou les grains au champ (blé, maïs, riz, orge) mais également au cours du stockage des produits agricoles, ou dans les papiers peints, les faux plafonds et les ventilations des logements insalubres.

La complexité de la mycotoxinogénèse vient du fait que la présence de champignon ne signifie pas systématiquement présence de mycotoxines et vice versa. Un champignon peut synthétiser plusieurs types de mycotoxines et une mycotoxine peut être produite par différents genres de champignons (tableau 7, inspiré du rapport de l'AFSSA, 2009).

?

Mycotoxines	Structure chimique	Principales moisissures productrices associées
Aflatoxine B1		<i>Aspergillus flavus, A. parasiticus, A. nomius</i>
Ochratoxine A		<i>Penicillium verrucosum, A. ochraceus, A. carbonarius</i>
Trichothécènes (A et B)		<i>Fusarium graminearum, F. culmorum, F. langsethiae, F. poae, F. sporotrichoides, F. tricinctum, Trichoderma spp, Stachybotrys spp.</i>
Fumonisine B1		<i>Fusarium graminearum, F. culmorum, F. crookwellense</i>
Zéaralénone		<i>Fusarium verticillioides, F. proliferatum</i>
Patuline		<i>Penicillium expansum, A.clavatus, Byssochlamys nivea</i>
Alcaloïdes d'ergot (dit ergot du seigle)		<i>Claviceps purpurea, C. paspali, C. africana, C. fusiformis</i>

?

????? q n, nAut R', ' ct R' clà IF' t R', à nRR' ct R'ne' , çht R'RN lat R'RN'ca' ?N'Nç, et ?IR?+55z Y?

?

nuReaçat R'Nçu h' à t u, ? nà à t ? nu, à hu , R'p' ct R'et R'et uçat R' à t u, ? ct R' à R' à q n, nAut R'nu, ?Nçart u, t R'e R' c'út ? à t u, ? ct ?wANnRh' mu? t R' à q n, nAut R' R' I?h) ? nçR' R' u, h' à t u, ?Nç ? ynht R'hd R, h' t Nt ue , ? ut ? ANnRh' mu? ct R' nç' ? , ? at ?uwR, ?Nç ? t A á ct ?u? t Il t, f' àuc ? mu? et R'Nn' R' ct R' c' dat R'ew' à t u, R' à q aât uR, t ?F' t ?à R'RNçt R'âncR'et R' à nRRnuR'Nçan ' Nt ?âmNhu mu?N' ?áF' t ?t, ?I, ? ? sn' çew' h'âm' st, ?et ?un' yt ? R'huyt R, h' muR' ? ? ? ? çR'et R' à nRR' ct R', nAundr ut R' , t ? R' v' nç?o ?oa ??vo ?Nt' yt u, ?t ?ayt ânNt ç? ?t hu' et R'ndt à t u, R' à het R', ? ? ? ? çar' ? ? R'nu, ?ct, çn' yat R' ? R' ? t u?e? R' ? R'Nç It çR'Nt hu, R'F' t ?e? R' ? R' ânRnuR'n' ? t u nçt ?e? R' ? R' A.Nç nueR' ? t f' +5/ôj? ? qR' ? , ? f' +55j?à nç? It x h (? , ? f' /zz ôj? ?t ?uR' . ?ubht x h (?t , ? f' +55?wANnRh' mu? ? ?uc ? ? mu? et R'RNçt R' ? nç?o ?Nç?

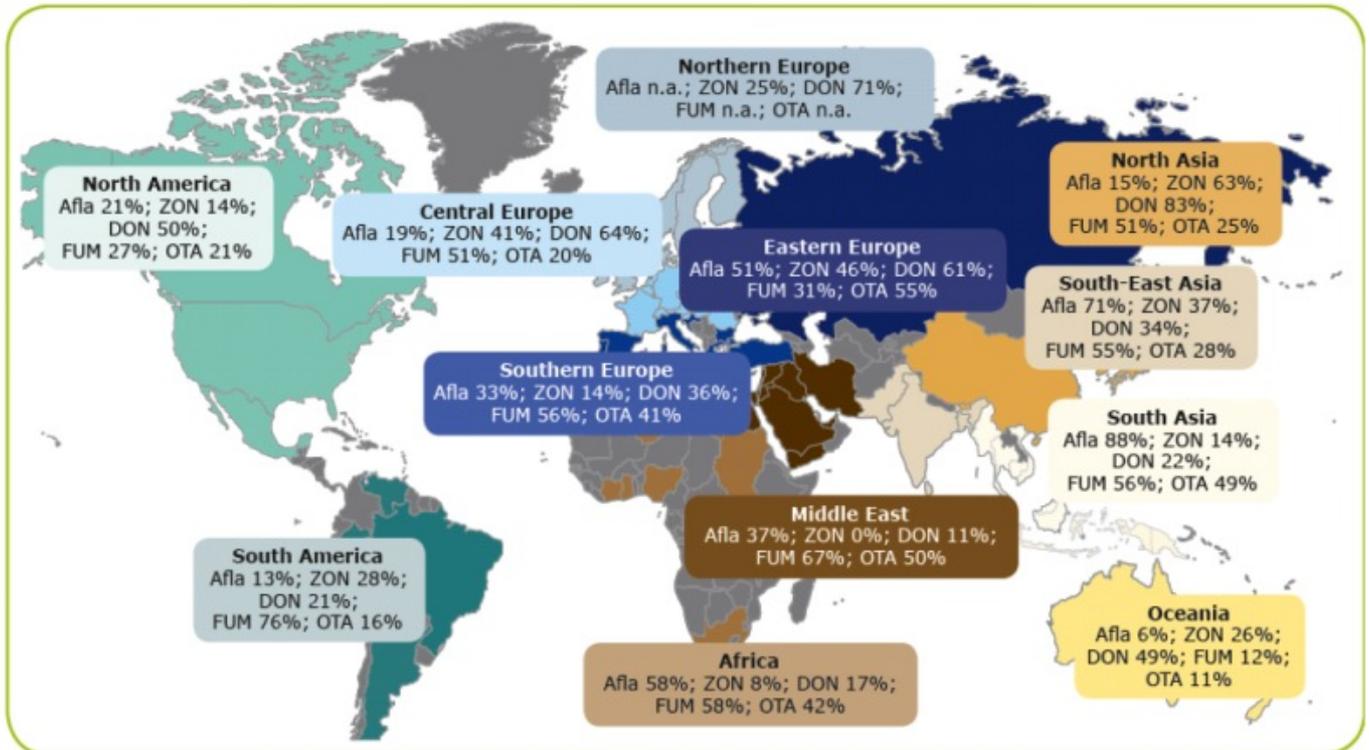
exemple, est alors fréquente tout au long de la vie et le faible diamètre (de 2 à 3 µm) de ces spores leur permet d'atteindre facilement le tractus respiratoire ou encore de traverser les alvéoles pulmonaires (Gauthier et al., 2012).

Si à l'heure actuelle, plus de 300 mycotoxines ont été recensées, leurs potentiels effets toxiques à l'égard de l'Homme et des animaux ont été identifiés pour seulement une trentaine d'entre elles. Leur présence étant ubiquitaire, l'apport de connaissance sur leurs propriétés toxigènes et le développement de procédés d'élimination ou d'inactivation de ces toxines présentent un véritable déficit pour la santé humaine et animale.

1. Contamination par la voie alimentaire

L'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) évalue à 25% la part des denrées contaminées par les mycotoxines au niveau mondial correspondant à un milliard de tonnes (CAST, 2003) (Figure 19A).

A.



B.

Fusarium verticillioides*Fusarium graminearum*

- A. % de contamination par les mycotoxines dans les différentes régions du monde réalisée par l'entreprise BIOMIN en 2011.
- B. Epis de maïs parasités par *F. verticilloïdes* (à gauche) et par *F. graminearum* (à droite)

Figure 19: Exposition par voie alimentaire : contamination des denrées par les mycotoxines

Cependant, il est difficile de réellement chiffrer les pertes financières du fait de la multiplicité et de la complexité des répercussions liées à la présence de ces toxines dans

l'alimentation (baisse de rendement des cultures, de la valeur des denrées contaminées et de la productivité dans le secteur de l'élevage, problèmes de santé humaine et animale).

En tant que contaminant alimentaire, ces mycotoxines se retrouvent dans les produits céréaliers mais également les fruits, noix, arachides, grains, fourrages ainsi que dans les produits dérivés de ces matières premières, destinés à la consommation humaine et animale (Figure 19B).

Les mycotoxicoses sont liées à l'ingestion **aiguë** ou **chronique** de mycotoxines. Une ingestion aiguë peut induire, en fonction de la nature de la toxine, des hépatites, des hémorragies, des néphrites, une nécrose de la peau et des muqueuses orales et intestinales, une agrunolose et des septicémies allant jusqu'à la mort (Pier et al., 1980).

Chez l'homme, la mycotoxicose la plus anciennement connue est l'**ergotisme**. Les symptômes de cette maladie due à l'ingestion de toxines produites par *Claviceps* entraînent un état de délire, prostrations, douleurs violentes, abcès, allant jusqu'à une gangrène des extrémités. Mais l'ergotisme n'est pas la seule maladie liée à une contamination par les mycotoxines. D'autres mycotoxicoses ont été découvertes plus récemment. Dans les années 1940, une pathologie suspectée d'être causée par les trichothécènes appelée l'**Aleucie toxique alimentaire (ATA)** a été responsable de la mort d'au moins 100 000 personnes en Union Soviétique. Cette maladie entraîne les symptômes suivants : fièvre, vomissements, inflammation aiguë du tube digestif, désordres sanguins et atteinte du système hématopoïétique pouvant aboutir à la mort de l'individu. Plus récemment en 2004 au Kenya, une intoxication aiguë due à l'ingestion de maïs contaminé à l'aflatoxine a entraîné la mort de 125 personnes (Lewis et al., 2005). Cependant, à l'heure actuelle, en Europe, l'exposition à des doses élevées de toxines demeure exceptionnelle grâce à la mise en place d'une réglementation sur de nombreuses mycotoxines identifiées pour leurs potentialités toxiques envers l'homme ou les animaux. Cependant, la présence de mycotoxines reste un problème de santé publique et animale du fait d'une exposition répétée à ces contaminants, en raison des habitudes alimentaires. En effet, elles peuvent produire des effets toxiques chroniques à de faibles voire très faibles doses (AFSSA, 2009; Oswald et al., 2005; Pinton et al., 2012a).

La littérature vétérinaire rapporte également des cas de mycotoxicoses, notamment le **syndrome de Turkey X** ou « maladie de la dinde », entraînant la perte en Angleterre des milliers de dindes, de canetons et autres animaux domestiques dans les années 1960 (AFSSA, 2009). Cette mycotoxicose s'est révélée être due à la présence d'aflatoxines, mycotoxines

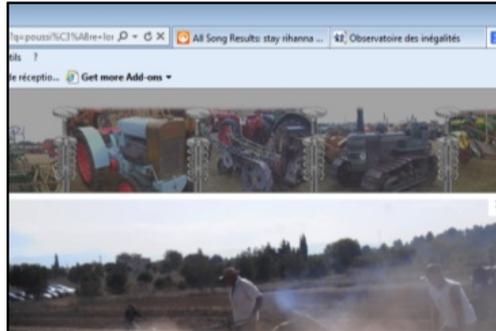
produites par *Aspergillus flavus* en quantités importantes dans la farine d'arachide importée du Brésil dont on nourrissait les volailles. Au-delà des mycotoxicoses due à une contamination aigue, l'ingestion de mycotoxines sur une longue période peut induire une diminution de la productivité, une détérioration de la qualité du produit mais également une toxicité pour certains organes.

2. Contamination par la voie respiratoire

Bien qu'essentiellement identifiées comme contaminants alimentaires, les mycotoxines peuvent emprunter d'autres voies d'entrées pour pénétrer dans l'organisme. Elles peuvent être absorbées par **la peau** ou encore **inhalées**.

Chez l'homme, l'inhalation de spores fongiques et d'éléments mycéliens émis en quantité dans l'air par les champignons entraîne des pathologies respiratoires et cutanées telles que des altérations du système immunitaire, une inflammation non spécifique des voies respiratoires, des dermatites, de l'asthme ou encore des mycoses broncho-pulmonaires allergiques (Bex et al., 2006; Cai et al., 2011). Une relation avec la présence de mycotoxines contenue dans ces spores a été montrée dans le cas de l'asthme (Schutze et al., 2010). Certaines professions du milieu agricole sont considérées comme des professions plus à risques vis-à-vis des problèmes respiratoires aigus ou chroniques liés à l'inhalation de mycotoxines contenues dans les poussières végétales (ATS, 1998). Le personnel des professions agricoles est donc plus sujet aux atteintes bronchiques (bronchite chronique, trouble ventilatoire obstructif et, de façon variable, asthme et alvéolites allergiques). Il a été montré par des expérimentations animales puis chez l'homme, que l'inhalation de toxines bactériennes ou fongiques, s'accompagnait d'un afflux de cellules inflammatoires (notamment de polynucléaires neutrophiles) au niveau des espaces aériens terminaux (Rylander, 1994). Dans les milieux à risque d'alvéolite allergique, l'intervention de mécanismes immuno-allergiques a été suggérée par des études épidémiologiques et immunologiques (Dalphin, 1996) (figure 20, d'après (Merchant, 1987)).

A.



B. **Tableau 1 : aérocontaminants agricoles et troubles respiratoires***

Substances végétales Céréales, foin, coton, lin, chanvre, tabac, café, thé, soja, oléagineux, épices, pollens,...	<ul style="list-style-type: none"> • Asthme, rhinite, • Bronchite chronique, • Obstruction bronchique,
Microorganismes <ul style="list-style-type: none"> • Moisissures • Bactéries (dont actinomycètes thermophiles) • Toxines bactériennes et fongiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Alvéolite allergique extrinsèque, • Organic dust toxic syndrome, • Asthme et hyperréactivité bronchique, • Obstruction bronchique chronique
Protéines et squames animales	<ul style="list-style-type: none"> • Asthme, rhinite, • Alvéolite allergique extrinsèque
Acarions et insectes	<ul style="list-style-type: none"> • Asthme, rhinite, • Alvéolite allergique extrinsèque
Produits chimiques et gaz toxiques NH_3 , H_2S , CO_2 , CO , NO_2 , SO_2 ,	<ul style="list-style-type: none"> • Toux, bronchiolite, asthme, • Oedème pulmonaire, fibrose

A. Illustration représentant une exposition des ouvriers agriculteurs aux poussières d'éléments mycéliens et autres aéro-contaminants au cours des moissons

B. Tableau regroupant les contaminants aériens agricoles et les troubles respiratoires associés adapté d'après Merchant, JA, 1987

Figure 20: Exposition par voie respiratoire du personnel agricole

Actuellement, la prévalence des allergies liées à la présence de moisissures touche près de 6% de la population totale. Les *Aspergillus* appartiennent à une grande famille de moisissures qui peuvent provoquer de l'asthme et des infections oculaires. Des études ont montré la présence d'aflatoxines, mycotoxines produites par les *Aspergillus*, dans l'air ambiant de moulin d'arachide, dans les ateliers de préparation d'aliments pour animaux ou dans les poussières de maïs lors de la moisson (Autrup et al., 1991). Dans certains cas, la présence de ces poussières est associée à des effets délétères sur la santé humaine. Une fréquence des cancers du foie et des poumons plus élevée a été mise en évidence chez des travailleurs d'une usine d'arachide, due à la présence d'aflatoxine, par rapport à des individus non exposés (Hayes et al., 1984).

Cependant, le personnel agricole n'est pas le seul à être exposé aux mycotoxines par voie respiratoire. En effet, la présence de moisissures toxigènes dans les logements insalubres est également une source d'exposition de la population aux mycotoxines pouvant être à l'origine de maladies infectieuses. Selon l'INSEE, le nombre de logements présentant des signes d'humidités sur les murs était de 5 848 en 2002 (figure 21).

A.



B.

Logements sans confort				
	2002 en Milliers	2002 en %	2006 en Milliers	2006 en %
Sans confort sanitaire : absence d'un des éléments (eau courante, installation sanitaire, WC intérieurs)	612	2,5	391	1,5
Immeuble insalubre ou menaçant de tomber en ruine (1)	267	1,1	273	1
Aucune installation pour faire la cuisine (1)	93	0,4	108	0,4
Aucun moyen de chauffage ou avec des moyens de chauffage sommaires	1 986	8,2	1 580	6
Electricité déficiente : installation non encastrée, fils non protégés par des baguettes, ou pas de prise de terre	1 167	4,8	1 030	3,9
Signes d'humidité sur certains murs	5 848	23,8	5 347	20,4
Infiltrations d'eau ou inondations provenant d'une fuite d'eau dans la plomberie	552	2,2	654	2,5

1. Compte tenu des faibles effectifs, le nombre de logements sans installation pour faire la cuisine ou dans un immeuble insalubre doit être considéré comme un ordre de grandeur. Lecture : 1 030 000 logements ont une électricité déficiente en 2006, soit 3,9% des résidences principales. Champ : France métropolitaine, résidences principales.

Source : Insee, enquêtes Logement.

- A. Illustration représentant des murs contaminés par des moisissures
 B. Tableau regroupant le nombre de logements insalubres en France en 2013 (INSEE)

Figure 21: Exposition par voie respiratoire à travers les logements insalubres

De plus, une étude réalisée en 2000 a consisté au prélèvement de 79 échantillons de papiers peints provenant d'immeubles finlandais humides afin d'identifier les genres fongiques et d'établir la présence potentielle de mycotoxines. Sur l'ensemble des

échantillons, 17 mycotoxines ont été identifiées. 24% des échantillons étaient positifs pour la stérigmatocystine, mycotoxine précurseur de l'aflatoxine et 19 % des échantillons étaient positifs pour une famille de mycotoxines, les trichothécènes, qui incluait les satratoxines G et H, le diacétoxyscirpénol (DAS), le 3-acétyl-déoxynivalénol (3a-DON), le déoxynivalénol (DON) et la toxine T-2 (Tuomi et al., 2000).

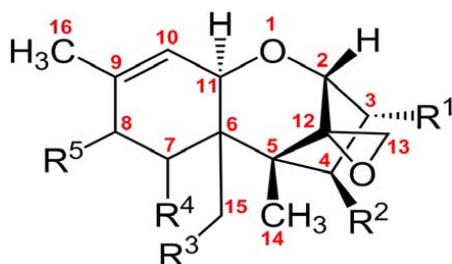
La présence de diverses moisissures productrices de nombreuses mycotoxines a été identifiée dans les échantillons de poussières et d'air ambiant de foyers canadiens (Kuhn and Ghannoum, 2003; Scott, 1986). De plus, la présence de mycotoxines de la famille des trichothécènes, notamment de la toxine T-2 a été également détectée dans des poussières de systèmes de ventilation (Smoragiewicz et al., 1993).

Parmi l'ensemble de ces mycotoxines identifiées, la famille des trichothécènes représente un véritable problème émergent du fait de l'augmentation de la présence des champignons producteurs de trichothécènes dans l'hémisphère nord et notamment en Europe.

Le déoxynivalénol (DON) et la toxine T-2 (T-2), ont donc été étudiées dans le cadre de cette étude. Leurs effets et propriétés respectives sont détaillés ci-après.

B. Les trichothécènes, puissants immuno-modulateurs

Produits principalement par les champignons du genre *Fusarium*, *Trichoderma* et *Stachybotrys*, les trichothécènes font partie du groupe des sesquiperténoïdes qui possèdent un squelette tricyclique, une double liaison en C-9,10 et un groupe époxyde en C-12-13 (Yagen and Bialer, 1993). Les trichothécènes sont divisés en quatre groupes selon leur structure chimique du type A au type D. Toutes les toxines de type A ont un groupement cétone, oxyde, hydroxyle ou ester en position C-8 alors que les toxines de type B possèdent toutes un groupement carbonyle en C-8 (Meissonnier et al., 2008). Ces deux groupes sont les plus largement représentés (Wannemacher and Wiener, 1991) (figure 21). Cependant, il existe aussi les trichothécènes de type C incluant la crotochine et les trichothécènes du groupe D composés de la verrucarine A et de la rorodin A (Ueno, 1984).



<i>Trichothécènes</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>	<i>R5</i>
Type A					
Toxine T-2	OH	OAc	OAc	H	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ COO
Toxine HT-2	OH	OH	OAc	H	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ COO
Diacétoxycripénol	OH	CH ₃ COO ⁻	CH ₃ COO	H	H
Type B					
Déoxynivalénol	OH	H	OH	OH	O
Nivalénol	OH	OH	OH	OH	O
Fusarénone-X	OH	OAc	OH	OH	O
15 acétyldéoxynivalénol	OH	H	OAc	OH	O
3 acétyldéoxynivalénol	OAc	H	OH	OH	O

Figure 22: Structures chimiques des principaux trichothécènes de type A et de type B d'après Meissonier et al. 2008

La première intoxication liée à la présence de trichothécènes est survenue en 1891 en Sibérie orientale et fut désignée sous le nom de **maladie chancelante** (Grevier-Rames, 1989). En 1940, ces mycotoxines sont suspectées d'être à l'origine de l'ATA décrite précédemment, révélant leur possible action sur les cellules de la réponse immunitaire. Cependant, ces toxines sont également connues pour leur action toxique vis-à-vis d'autres cellules eucaryotes aussi bien chez les plantes que chez les animaux. En effet, une de leur particularité repose sur leur capacité à inhiber la synthèse protéique. Ainsi, il a été montré que les trichothécènes ont la capacité d'inhiber une enzyme des ribosomes eucaryotes appelée la peptidyl-tranférase en se liant à la sous-unité 60S stoppant ainsi la synthèse des protéines (Liao et al., 1976). Il semble également que le DON, comme la toxine T-2, ait une action indirecte en facilitant le clivage de l'ARN 28S ou en le rendant inaccessible aux ribonucléases cellulaires expliquant en partie leur activité ribotoxique (Li and Pestka, 2008). De plus, ils altèrent la structure des membranes et les fonctions mitochondriales et

conduisent également à l'apoptose cellulaire notamment au sein de la lignée T Jurkat humaine (Rocha et al., 2005). Dans d'autres cas, le DON peut entraîner l'apoptose des cellules par activation de la caspase 3 (Zhou et al., 2005).

Parmi les espèces animales les plus touchées par l'exposition aux trichothécènes, l'espèce porcine compte parmi les plus sensibles. Celui-ci a donc été choisi comme modèle expérimental dans ce travail tout d'abord car il est une cible de l'exposition aux mycotoxines par son alimentation riche en céréales mais également parce que c'est une espèce modèle pour l'homme notamment à travers ses similitudes avec le système immunitaire humain. Ainsi, l'essentiel des données de toxicité aiguë, chronique et de cytotoxicité regroupées dans les chapitres ci-après ont été observées et obtenues chez cette espèce.

1. Les trichothécènes de type A

Les trichothécènes de type A regroupent, entre autres, **la toxine T-2 (T-2)**, la toxine HT-2 (HT-2) et le diacétoxyscirpénol (DAS).

Au cours de ce travail de recherche, un focus sur les effets de la toxine T-2 a été entrepris. En effet, cette mycotoxine est le **trichothécène de type A** le plus communément retrouvé dans l'hémisphère nord.

1.1. La toxine T-2

La toxine T-2 correspond au 12,13-epoxytrichothec-9-ene-3,4,8,15-tetraol,4,15-diacetate8-isovalerate, de formule brute : $C_{24}H_{34}O_9$. Elle est produite principalement par *F. sporotrichoïdes*, *F. langsethiae* et *F. poae*. Malgré sa répartition mondiale, son niveau de contamination est largement inférieur au niveau de contamination atteint par les trichothécènes de type B décrit dans le paragraphe 2 de ce chapitre (AFSSA, 2009). Cependant, la toxine T-2 a été montrée comme étant la plus toxique de la famille des trichothécènes.

1.2. Niveau de contamination par la toxine T-2

La toxine T-2 est retrouvée majoritairement sur les produits céréaliers.. En effet, des cas de contamination par les toxines T-2 et HT-2 ont été décelés dans des cultures de blé et d'orge dans divers pays asiatiques, au Japon, en Chine ou encore au Népal et en Corée.

Cependant, bien que retrouvée à l'échelle mondiale, elle est plus largement retrouvée dans l'hémisphère nord, et l'Europe ne fait pas exception à cette règle. Une étude réalisée en 2010 a permis de déterminer le niveau de contamination. Celle-ci regroupait 12 participants européens. Un total de 3490 échantillons ont été analysés pour la toxine T-2 et parmi ces échantillons 20% étaient contaminés touchant tous types de céréales (blé, orge, avoine, seigle). 21% des échantillons de blé contenaient de la toxine T-2 à des niveaux de concentrations variables (compris entre 2 à 160 µg/kg). Seulement 3% des échantillons d'orge et 16% des échantillons d'avoine étaient contaminés par la toxine T-2. En revanche, leurs concentrations étaient nettement plus importantes. Par exemple pour l'orge, les concentrations de toxine T-2 pouvaient atteindre 280 µg/kg et 550 µg/kg dans l'avoine (EFSA, 2010).

1.3. Exposition à la toxine T-2 et réglementation/recommandation

européenne

La consommation journalière de ces toxines issues des céréales a été estimée par Eriksen et Alexander en 1998 à **130 ng/kg de poids corporel (pc)** (Eriksen and Alexander, 1998). En France, selon le rapport de l'Afssa publié en 2009, les niveaux d'exposition moyens des adultes et des enfants ont été respectivement estimés à **75 ng/kg pc/j et 111 ng/kg pc/j** (AFSSA, 2009). En Europe, l'exposition aux toxines T-2 et HT-2 est estimée respectivement à **8 ng/kg pc/j et à 9 ng/kg pc/j**.

Depuis le 27 mars 2013, le journal officiel de l'Union Européenne détermine une **dose journalière tolérable (DJT) de 100 ng/kg pc** pour la somme des toxines T-2 et HT-2 (Commission Européenne., 2013).

1.4. Toxicité de la toxine T-2

Chez l'animal, la toxine T-2 est rapidement absorbée après ingestion et distribuée de manière similaire dans l'organisme sans accumulation dans un organe spécifique. La toxine T-2 est rapidement métabolisée par déacétylation, hydroxylation, glucuroconjugaison et dé-époxydation : la principale voie de biotransformation est une déacétylation qui aboutit à la formation de la toxine HT-2 (EFSA, 2010).

Les études *in vivo* réalisées avec les trichothécènes de type A ont montré des effets cliniques variables en fonction de l'espèce animale utilisée, des voies de contamination ou du mode d'administration des toxiques, de la durée d'exposition et des concentrations utilisées.

1.4.1. Toxicité aiguë de la toxine T-2

D'après le JECFA (comité joint d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires), chez les rongeurs, la dose létale 50 (DL₅₀) est comprise entre 5 et 10 mg/kg de pc (JECFA, 2003a). Cependant en 1987, Creasia et son équipe réalisent une expérience à l'aide du modèle rat visant à déterminer les effets toxiques d'une inhalation de forte dose de toxine T-2 (comprise entre 0,02 mg de T-2/L d'air et 2,4 mg de T-2/L d'air). Dans cette étude, les auteurs ont observé une importante toxicité allant de la léthargie, des frissonnements et de la prostration jusqu'à la mort. Les valeurs de DL₅₀ obtenues pour les jeunes rats étaient de 0,24 mg/kg pc et 0,94 mg/kg pc pour des rats adultes. Ils ont pu déterminer qu'une inhalation de toxine T-2 (en toxicité aiguë) s'avère 10 fois plus toxique qu'une administration systémique (DL₅₀ de 4,5 mg/kg pc) et 20 fois plus toxique qu'une exposition dermale (DL₅₀ de 10 mg/kg pc) (Creasia et al., 1987).

Chez le porc, une administration par voie intraveineuse (*i.v.*) de 0,13 à 3,2 mg/kg pc induit des vomissements, une parésie postérieure et une léthargie, des mouvements désordonnés, de fréquentes défécations, une importante mastication et salivation. La DL₅₀ pour une administration en *i.v.* de toxine T-2 chez des porcs de 3 à 50 kg est de l'ordre de 1,2 mg/kg pc (Pang et al., 1986). D'autres voies d'expositions à la toxine T-2 chez le porc ont été également étudiées et notamment l'exposition par inhalation ou via une application locale au niveau du derme. Ces applications ont également induits des vomissements, des cyanoses,

des anorexies, une léthargie, une faiblesse des parties postérieures, une fièvre persistante, des rougeurs de la peau associée à des ulcérations des surfaces de l'épiderme et des œdèmes (Pang et al., 1987a, , 1988; Pang et al., 1987c). En 1990, Creasia et ses collaborateurs réalisent une étude comparant deux voies différentes d'administration de fortes doses de toxine T-2 chez le porc. Les résultats de cette étude montrent que les lésions observées à la suite d'une inhalation de fortes doses de toxine T-2 sont équivalentes à celles observées après une administration systémique (Creasia et al., 1990).

Chez le porc, une administration par inhalation de 10 mg de T-2/kg pc (Creasia and Lambert, 1987), provoque une mortalité des animaux, associée à des hémorragies au niveau du ventricule gauche et une congestion des méninges. De graves lésions macroscopiques et microscopiques étaient observées au niveau de la muqueuse gastrique et intestinale associées à des nécroses sur l'ensemble des organes lymphoïdes.

En association avec des effets émétiques, léthargiques et nécrotiques du derme, l'administration d'une forte dose de toxine T-2 purifiée qu'elle soit par *i.v.*, orale, ou via un aérosol entraîne une déplétion des cellules de la lignée lymphocytaire tout en induisant une nécrose des tissus lymphoïdes. Chez le porc, des nécroses multiples ont été observées dans le cortex du thymus (Pang et al., 1986). Il en est de même au sein d'autres espèces telles que les poulets, les oiseaux et les lapins présentant également des atteintes nécrotiques ou des atrophies du thymus (Meissonnier et al., 2008). Ces lésions sévères aux niveaux des organes lymphoïdes ont un impact sur les réponses immunitaires qu'elles soient de nature inflammatoires, humorales ou cellulaires.

1.4.2. Toxicité subchronique de la toxine T-2

Des porcs nourris avec une alimentation contaminée par 5 à 10 mg de toxine T-2/kg d'aliment présentent une réduction de la prise alimentaire et une perte du gain de poids altérant ainsi leur performance (Harvey et al., 1994; Weaver et al., 1978). Il est à noter que ces symptômes de refus de prise alimentaire, réduction de gain de poids ou encore ulcération de la cavité orale se retrouvent également sur les poussins ou canards alimentés en présence de 0,2 à 4 mg de toxine T-2/kg d'aliment. Une étude menée chez le singe exposé pendant 4 à 5 semaines à 0,1 mg/kg pc a permis d'observer une diminution

importante du nombre de leucocytes (40%), de lymphocytes B et T (Jagadeesan et al., 1982) confirmant les effets hématotoxiques et immunotoxiques de la toxine T-2 .

1.4.3. Effets de la toxine T-2 sur les muqueuses pulmonaires et intestinales

1.4.3.1. Effets sur la muqueuse pulmonaire

La voie aérienne est connue pour être l'une des voies d'exposition à la toxine T-2 pouvant affecter le tractus respiratoire. L'équipe de Pang *et al.* (1988) a mesuré l'impact d'une inhalation de toxine T-2 chez le porc (8 mg/kg pc, dose non létale) sur différents paramètres zootechniques, hématologiques et immunitaires. Ces auteurs observent chez les animaux traités à la toxine T-2 : léthargie, cyanose, anorexie et perte de poids. D'un point de vue hématologique, la concentration en protéines totales dans le sérum et la concentration en hémoglobine sont diminuées. D'un point de vue immunologique et hématologique, le nombre de lymphocytes décroît tandis que le nombre de polynucléaires augmentent (Pang et al., 1987a, , 1988).

D'autres essais d'immunotoxicologie ont également été réalisés utilisant les modèles cellulaires *in vitro*. Ainsi Gerberick et Sorenson montrent dans des macrophages alvéolaires de rat qu'une exposition pendant 20h à une forte concentration de toxine T-2 (100 nM) induit une cytotoxicité de ces cellules (Gerberick and Sorenson, 1983; Li et al., 2006).

1.4.3.2. Effets sur la muqueuse intestinale

Les cavités orales et le tractus gastro-intestinal sont les cibles préférentielles de la toxine T-2 lors de la prise alimentaire. Cependant comme montrée dans le paragraphe précédent, une administration par inhalation de la toxine T-2 peut également affectée les muqueuses intestinales (Thurman et al., 1988).

Un syndrome hémorragique (gastro-intestinal a pu être associé à l'ingestion d'aliment naturellement contaminé par les trichothécènes (toxines T-2 et HT-2, DAS, DON, 15a-DON et nivalénol) chez le porc (Abramson et al., 1997). Chez de jeunes porcelets exposés par voie orale à des doses non létales comprises entre 0,04 et 0,64 mg/kg pc (1 à

16 mg T-2/kg d'aliment) pendant 8 semaines, il a été observé une diminution du gain de poids dès 0,04 mg/kg pc avec refus de s'alimenter et de légères lésions au niveau de la cavité orale (Weaver et al., 1978). Chez le porc, une administration par voie intraveineuse de toxine T-2 induit des lésions au niveau de la muqueuse intestinale. Une altération et une nécrose des cellules épithéliales associée à des villosités atrophiées ont été les principales lésions microscopiques observées (Pang et al., 1987b). Il est également à noter que les organes lymphoïdes associés à l'intestin et les nœuds lymphatiques mésentériques sont également affectés par les trichothécènes de type A. Une exposition à ces composés conduit à une déplétion des lymphocytes et une nécrose des lymphocytes des follicules lymphoïdes intestinaux (Weaver et al., 1978).

Dans d'autres espèces, la consommation d'une alimentation contaminée à la toxine T-2 (0,6 ou 0,3 mg/kg pc/j) par des agneaux conduit à l'apparition de dermatites et de lésions au niveau de la commissure des lèvres dès la première semaine de traitement (Friend et al., 1983). Nagata *et al.* (2001) montrent que 24h après une exposition par voie orale à de forte dose de toxine T-2 (10 mg/kg), les souris exposées ont une augmentation de l'apoptose des lymphocytes et changements des sous-populations lymphocytaires dans le thymus, les nœuds lymphatiques mésentériques et les plaques de Peyer (Nagata et al., 2001).

Quel que soit le mode d'administration de cette toxine, les principaux tissus mis en cause se révèlent être les tissus hématopoïétiques, lymphoïdes et intestinaux. Ainsi comme attendu, les effets observés au niveau cellulaire affectent principalement les cellules à haut taux de prolifération élevée (cellules hématopoïétiques, cellules du système immunitaire et cellules épithéliales intestinales).

1.4.4. Effets hématopoïétiques

Les trichothécènes de type A ont un effet hématotoxique majeur. Ils affectent la moelle osseuse hématopoïétique, les cellules de la circulation sanguine et agissent également sur la coagulation et l'hémostase. D'après De Nicola *et al.* (1978), l'organe cible de la toxicité de la toxine T-2 après exposition unique ou répétée est le tissu hématopoïétique (De Nicola et al., 1978). Les principaux symptômes produits par la toxine T-2 se résument en une réduction des globules rouges et des plaquettes (anémie) et une diminution des globules blancs (leucopénie). Une exposition dans le modèle souris à la

toxine T-2 (10 ppm) pendant 2 semaines montre une hypoplasie de la moelle osseuse conduisant à une leucocytose et une leucopénie, ainsi qu'une inhibition de l'érythropoïèse dans la moelle osseuse et la rate (Parent-Massin, 2004). De plus, des études *in vitro* sur cellules humaines et de rat ont montré que la toxine T-2 est fortement cytotoxique pour les progéniteurs hématopoïétiques aussi bien des lignées granulocytaires et monocytaires qu'érythrocytaires et plaquettaires (Lautraite et al., 1995; Rio et al., 1997). *In vitro*, Ledréan et al. (2005) montrent également que la toxine T-2 induit l'apoptose des progéniteurs hématopoïétiques issus du sang de cordon ombilical humain après 6 heures d'incubation en présence de faible concentration de T-2 (Le Drean et al., 2005).

1.4.5. Effets sur les cellules immunitaires

1.4.5.1. Effets sur les macrophages et cellules dendritiques

Les études réalisées sur les cellules inflammatoires montrent un effet inhibiteur des trichothécènes de type A sur les fonctions de ces cellules.

Sur des modèles *in vitro* de macrophages alvéolaires de rat, 10 à 100 nM de toxine T-2 induit un effet inhibiteur sur la synthèse d'ARN et protéique, sur la phagocytose mais aussi une diminution de la réponse macrophagique après stimulation par le ligand du TLR4, le lipopolysaccharide (LPS) (Sorenson et al., 1986). Ces mêmes observations ont été reportées par Vidal et al. (1989) sur un modèle de macrophages péritonéaux murins (Vidal and Mavet, 1989). Dugyala et Sharma, (1997) montrent que des souris traitées oralement avec de la toxine T-2 présentent une diminution de la production de TNF- α , d'IL-1 α et d'IL-6 par les macrophages péritonéaux stimulés par le LPS (Dugyala and Sharma, 1997). Hymery et al. (2009) ont montré *in vitro* que la toxine T-2 inhibe la différenciation des monocytes en macrophages et cellules dendritiques d'origine humaine (Hymery, 2006; Hymery et al., 2009).

Les cellules dendritiques sont également des cibles de cette mycotoxine. La toxine T-2 inhibe le processus de maturation des cellules dendritiques. L'incubation pendant 2 jours en présence de 1 à 10 nM de toxine T-2 induit une diminution du marqueur de surface CD86 et réduit la sécrétion d'IL-10 et d'IL-12 nécessaire à l'activation des cellules T (Hymery et al., 2006).

1.4.5.2. Effets sur les cellules lymphocytaires

Nagata *et al.* (2001) ont analysé les différentes sous populations de lymphocytes après 24h d'exposition orale aux trichothécènes de type A (10 mg/kg). Ils observent ainsi une diminution du nombre de lymphocyte T CD4⁺ et CD8⁺ mais aussi des lymphocytes B dans le thymus, les nœuds lymphatiques mésentériques et les plaques de Peyer (Nagata et al., 2001). Chez des veaux, une forte dose de toxine T-2 (0,6 mg/kg pc/j) réduit la prolifération lymphocytaire aux différents mitogènes (ConA, PHA) (Buening et al., 1982). Une exposition *in vitro* à la toxine T-2 induit aussi une diminution de l'activité des lymphocytes NKT (Berek et al., 2001).

2. Les trichothécènes de type B

Les trichothécènes de type B regroupent, le déoxynivalénol (DON), ses dérivés acétylés, le 3-acétyl-DON et le 15-acétyl-DON ou encore la fusarénone X. Au cours de ce travail de recherche, l'étude des effets immunomodulateurs de la toxine la plus connue de la famille des trichothécènes : le **DON** ou 3 α ,7 α ,15-trihydroxy-12,13-epoxytrichithec-9-en-8-one, de formule brute C₁₅H₂₀O₇ a été entreprise.

2.1. Le déoxynivalénol (DON)

Le DON a été caractérisé par isolement dans de l'orge et dans du maïs (Vesonder et al., 1973) infecté par *Fusarium*. Cette toxine est principalement synthétisée par *F. graminearum* et *F. culmorum*, deux pathogènes importants du blé, de l'orge, de l'avoine, du seigle, du maïs mais aussi du riz et du sorgho. Le DON est la principale mycotoxine retrouvée en France et les pertes dues à la contamination par le DON aux Etats-Unis sont estimées à 655 millions de dollars majoritairement en raison des pertes de récoltes de blé (Schmale III and Munkvold, 2009). Cette mycotoxine est également appelée « vomitoxine » du fait de sa capacité à induire, à forte concentration des vomissements chez le porc.

2.1.1. Distribution et niveau de contamination par le DON

La contamination par les moisissures produisant du DON a lieu dans des conditions de température (19-20 °C) et d'humidité élevée (Rotter et al., 1994). Comme la toxine T-2, on retrouve des contaminations par le DON dans de nombreuses denrées alimentaires dans différentes régions du monde. Souvent inférieure à 1 mg/kg d'aliment, la contamination mondiale en DON peut atteindre ponctuellement 5 à 20 mg/kg dans certaines farines de maïs destinées à l'alimentation humaine (Abouzied et al., 1991). En 2001, la FAO a montré que le DON est fréquemment retrouvé dans les céréales. Sur l'ensemble des échantillons testés, 73% des échantillons de blés et 92% des échantillons de maïs étaient positifs (Canady et al., 2001). Au Canada, Lombaert *et al.*, (2003) ont publié une étude montrant que 63% des céréales destinées à l'alimentation pour enfant est contaminée par la présence de DON (Lombaert et al., 2003). Une étude réalisée entre 1999 et 2002 sur l'ensemble de 12 pays européens a montré des niveaux de contamination en DON variable allant de 5000 µg/kg aux Pays-bas contre 376 µg/kg en Finlande (tableau 8) (European-commission, 2003).

De plus, il est à noter qu'en France, d'après cette même étude que 100% des échantillons de blé analysés étaient contaminés par le DON ; les niveaux de contamination en France faisant partie des plus élevés (2135 µg/kg) après les Pays-bas.

Pays	Année	nombre d'échantillons analysés	échantillons positifs	contamination moyenne (µg/kg)	contamination maximum (µg/kg)
Autriche	1999	68	57%	311	1250
Belgique	2001	33	15%	343	504
Finlande	2001	39	36%	91	376
France	2001	53	100%	193	2125
Allemagne	1999	26	81%	285	764
Pays Bas	2000	1114	77%	354	5000
Norvège	2001	64	53%	155	464
Portugal	2002	3	33%	744	744
Suède	2001	44	100%	1427	2033

Tableau 8: Niveaux de contamination par le DON relevés entre 1999 et 2002 dans le blé de plusieurs pays européens

2.1.2. Exposition au DON et réglementation

En France, le niveau moyen d'exposition d'un adulte au DON est de 0,28 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{j}$ et peut atteindre 0,57 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{j}$. Les enfants sont exposés à une dose en DON en moyenne de 0,45 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{j}$ (AFSSA, 2009). Aujourd'hui, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) vient de publier les résultats de son étude de l'alimentation totale (étude EAT2) initiée en 2006. Cette étude montre une hausse des expositions pour le DON en comparaison du niveau retrouvé lors de la première étude (EAT1) réalisée entre 2001 et 2005 (Anses, 2011). Les principaux aliments contribuant à cette exposition sont le pain. Ainsi, le risque toxicologique ne peut être écarté pour le DON et ses dérivés acétylés.

Un certain nombre de pays ont fixé des concentrations maximales obligatoires ou indicatives pour le DON dans les aliments destinés à la consommation humaine et animale. Ainsi, l'Europe a adopté un règlement fixant des teneurs maximales en DON dans différents produits. Ces données sont rassemblées dans le tableau 9 (European-commission, 2005). En ce qui concerne l'alimentation animale, la Commission Européenne a émis une recommandation à hauteur maximum de 8 mg/kg de matières premières dans les céréales, exceptée pour les sous-produits du maïs où la concentration recommandée est de 12 mg/kg.

A.

Produits	Teneur maximale ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Céréales brutes autres que blé dur, avoine et maïs	1250
Blé dur et avoine bruts	1750
Maïs brut	1750
Farine de céréales, y compris la farine de maïs, le gruau de maïs et le maïs moulu	750
Pain, pâtisseries, biscuits, collations aux céréales et céréales pour petit déjeuner	500
Pâtes (sèches)	750
Préparations à base de céréales et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge	200

B.



Tableau 6 : Teneurs maximales en DON dans les denrées alimentaires destinées à l'alimentation humaine

Produits	Teneur maximale recommandée en $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour un aliment pour animaux ayant une teneur en humidité de 12%
Matière première entrant dans la composition des	

Tableau 9: Teneurs maximales de DON dans les denrées alimentaires destinées à l'alimentaire humaine (A) et animale (B)

2.1.3. Toxicité aiguë

La DL₅₀ du DON administrée par voie orale chez la souris est égale à 34 mg/kg pc soit 3 à 5 fois plus élevée que celle de la toxine T-2 (Forsell et al., 1987). Parmi les espèces animales, le porc est plus sensible vis-à-vis des trichothécènes que le rat (Vesonder et al., 1979), les volailles et surtout les ruminants (Rotter et al., 1996; Trenholm et al., 1984). En effet, pour des doses beaucoup plus faibles (100 µg/kg pc) que celle utilisée dans le modèle murin, le DON a déjà un fort pouvoir émétique (Forsyth et al., 1977). La dose émétique la plus basse chez le porc après une ingestion par voie orale de DON est comprise entre 0,05 et 0,2 mg/kg pc. Les effets observés dans les études de toxicité aiguë au DON chez l'animal sont des nécroses tissulaires au niveau du tractus intestinal, de la moelle osseuse et des tissus lymphoïdes (AFSSA, 2009). Une exposition aiguë à des concentrations de DON entraîne des effets similaires à ceux observés lors d'une exposition à la toxine T-2 : salivation importante, malaise, diarrhées, vomissements, leucocytose et hémorragies gastro-intestinales (Pestka and Smolinski, 2005). Au sein de cette espèce, les refus alimentaires, la perte de poids et les diarrhées sont particulièrement fréquents en présence de nourriture contaminée ce qui suggère un lien entre l'effet du DON et les mécanismes d'appétence (Girardet et al., 2011).

2.1.4. Toxicité subchronique

Chez la souris, des études de toxicité chronique (de 7 à 56 jours d'exposition) ont été réalisées jusqu'à des doses inférieures à 0,7 mg/kg pc/j. Les résultats de cette étude mettent également en évidence une réduction de la prise alimentaire, une diminution du gain de poids et une modification des paramètres sanguins et notamment du taux d'immunoglobulines sériques chez cette espèce (AFSSA, 2009).

Toutes les espèces ne présentent pas les mêmes profils de sensibilité au DON. Ainsi, les volailles tolèrent le DON dans leur alimentation sans que cela n'affecte la productivité jusqu'à 8 mg/kg d'aliment (Hamilton et al., 1985). En comparaison, l'ingestion de 1 à 2 mg/kg pc/j de DON chez le porc, produit des refus totaux ou partiels de prise alimentaire. De plus, lors d'études réalisées sur de jeunes porcelets recevant une nourriture naturellement contaminée par le DON pendant 3 semaines des doses comprises entre 0,04 et 0,06 mg/kg pc/j sont sans effets (Pinton et al., 2012a).

2.1.5. Effet sur les muqueuses pulmonaire et intestinale

Le DON agit principalement sur les cellules à haut taux de renouvellement cellulaire comme les épithéliums, composant majeur des muqueuses. En effet, afin de maintenir efficacement sa fonction de barrière, l'épithélium intestinal par exemple se régénère approximativement une fois par semaine tout au long de la vie.

2.1.5.1. Effets sur la muqueuse pulmonaire

Très peu d'études concernent les effets du DON sur le tractus respiratoire. En 2009, la cytotoxicité du DON a été étudiée sur un modèle *in vitro* de culture primaire de macrophages porcins (PAM) non activés ou activés par le LPS. Les auteurs ont montré que le DON en présence de LPS augmente l'expression des gènes de l'inflammation (TNF- α et IL-1 β) (Doll et al., 2009). Li *et al.* (2007) ont étudié chez la souris l'effet d'une exposition orale au DON (10 mg/kg pc) en réponse à une infection virale respiratoire, et ont montré que chez les animaux soumis au régime supplémenté en DON, l'infection par un réovirus respiratoire est exacerbée et ces animaux montrent des dommages alvéolaires importants. Dès le 3^{ème} et le 7^{ème} jour post-infection, le taux de protéines totales, de cytokines pro-inflammatoires (MCP-1 et TNF-alpha), le nombre de macrophages, neutrophiles et lymphocytes de ces animaux augmente dans le liquide broncho-alvéolaire comparé aux souris contrôles infectées par le réovirus suggérant que le DON peut compromettre la résistance aux infections virales respiratoires (Li et al., 2007). Une étude réalisée sur un modèle *in vitro* de cellules épithéliales alvéolaires humaines (A549) a permis d'établir qu'une exposition à différentes concentrations de DON induit une cytotoxicité cellulaire mais également à des doses non cytotoxiques, une réduction de la synthèse protéique, de la prolifération et de la survie cellulaire de façon dose-dépendante (Instanes and Hetland, 2004).

2.1.5.2. Effets sur la muqueuse intestinale

Une exposition au DON (de 0,2 à 5 μ M) induit des lésions au sein du jéjunum observées après seulement 4 heures d'exposition sur un modèle *ex vivo* de culture d'explant

de jéjunum de porc associées à une fusion des vili, une lyse des entérocytes et des œdèmes (Kolf-Clauw et al., 2009). Sur un modèle *in vitro* de cellules de colon humain (Caco2), une exposition au DON aux concentrations croissantes allant de 84 nmol à 84 µmol induit une réduction de la synthèse protéique, de la prolifération et de la survie cellulaire (Instanes and Hetland, 2004). Tout comme sur des modèles cellulaires de colon humain, la lignée de cellule épithéliale intestinale porcine (IPEC-1) est également sensible au DON (Pinton et al., 2012a). Sur différents modèles de cellules épithéliales intestinales humaines (HT-29, Caco2 et T84), de façon comparable aux effets observés avec les IPEC-1, le DON induit une diminution dose-dépendante de la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) suggérant l'impact de ce composé sur les fonctions de perméabilisation de la barrière intestinale (Kasuga et al., 1998; Maresca et al., 2002; Maresca et al., 2008; Pinton et al., 2009). Chez le porc, Pinton et al. (2009, 2010) ont montré que le DON altère les fonctions de la barrière épithéliale intestinale en induisant une augmentation de la perméabilité de cette barrière liée à une réduction de l'expression de certaines protéines de jonctions serrées, les claudines 3 et 4 (Pinton et al., 2010; Pinton et al., 2009).

2.1.6. Effet sur les cellules immunitaires

Les études sur les effets immuno-toxiques des mycotoxines ont été initiées il y a 25 ans à la suite de cas d'immunosuppression rapportés dans la littérature vétérinaire (Pier et al., 1980). Selon la dose et la durée d'exposition, les trichothécènes induisent soit une immunostimulation à faible dose soit une immunodépression à forte dose (Bondy and Pestka, 2000). Tout comme la toxine T-2, le DON semble particulièrement cibler les cellules et les fonctions du système immunitaire.

2.1.6.1. Effets sur les macrophages et cellules dendritiques

Le DON *in vivo* a été décrit comme stimulant la production de certaines de ces cytokines pro-inflammatoires et notamment l'IL-1 et l'IL-6 mais aussi la production de certaines chémokines telles que la macrophage inhibitory protein-2 (MIP-2) ou les monocytes chemoattractant protein 1 et 3 (MCP-1 et 3) (Bouhet and Oswald, 2005; Pestka et al., 2004). Doll *et al*, (2009) ont mis en évidence que le DON augmente l'expression

d'ARNm de l'IL-1 β dans un modèle *in vitro* de culture primaire de macrophages pulmonaires porcins (Doll et al., 2009). De plus, Kankkunen *et al.*, (2009) ont montré que les macrophages humains pouvaient reconnaître les trichothécènes comme un signal de danger. Le DON a ainsi la capacité d'activer la caspase-1 permettant la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 (Kankkunen et al., 2009). Le DON peut aussi induire une diminution de la production de NO (nitrite oxyde) et d'IFN- β initiée par le LPS dans un modèle murin de macrophages (RAW) (Sugiyama et al., 2010) ou encore altère l'activation des macrophages dérivés du sang humain (Wache et al., 2009).

Le DON modifie le phénotype et la maturation des cellules dendritiques différenciées à partir de monocytes sanguins *in vivo* et *in vitro* (Bimczok et al., 2007). Ces mêmes conclusions ont été rapportées par l'équipe de Luongo *et al.*, (2010) sur un modèle de DCs murines (Luongo et al., 2010).

2.1.6.2. Effets sur les cellules lymphocytaires

Les lymphocytes peuvent être également des cibles du DON. *In vitro*, il a été montré qu'une dose de 216 ng de DON/ml diminue de 50% la capacité de prolifération des lymphocytes stimulés par des mitogènes (Meky et al., 2001).

Chapitre 3 : Méthodes de décontamination des mycotoxines

Compte tenu de leurs prévalences et de leurs toxicités, le risque lié à la présence de champignons toxigènes et de leurs toxines associées fait depuis des années l'objet de recherche dans le but d'éliminer ce risque en développant des méthodes de décontamination. De nombreuses stratégies sont développées pour limiter ou empêcher la croissance des champignons toxigènes et pour décontaminer et/ou détoxifier les aliments contaminés en mycotoxines. Ces stratégies incluent en premier lieu : les bonnes pratiques culturales (rotations des cultures, labours, traitements phytosanitaires....) constituant la prévention de la contamination en mycotoxines dont nous ne feront pas mention dans cette synthèse bibliographique. D'autres stratégies sont mises en place visant à la décontamination des mycotoxines présentes dans l'environnement et à l'inhibition de l'absorption des mycotoxines au sein des muqueuses telles que la muqueuse intestinale par exemple. L'utilisation de ces techniques pour éliminer ou réduire la teneur en mycotoxines nécessite cependant de répondre à d'autres critères d'évaluation. En effet, la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) tout comme l'EFSSA ont établi certaines lignes directrices dans l'évaluation de ces procédés de détoxification et décontamination. Ces procédés doivent inactiver, détruire, ou éliminer la ou les mycotoxines mais également veiller à : 1/ ne pas aboutir à la production de substances toxiques, métabolites ou sous-produits dans l'alimentation, 2/ conserver les valeurs nutritives et l'acceptabilité des denrées alimentaires, 3/ne pas altérer les propriétés technologiques des produits et si possible détruire les spores fongiques. En plus de ces critères, les procédés doivent être facilement accessibles, facile d'utilisation et peu coûteux.

L'ensemble des méthodes de décontamination regroupent de nombreuses approches qui peuvent être de nature physique, chimique ou biologique.

1. Les méthodes physiques

L'approche physique la plus efficace consiste à trier les grains moisissés et contaminés éliminant ainsi la majeure partie des toxines (Meister, 2004). Ainsi selon l'étude de Trenholm

et al. (1991), le tamisage de grain de maïs contaminé en présence de 23 mg de DON/kg et de 1,2 mg de zéaralénone (ZEA)/kg d'aliment a permis de réduire respectivement de 73% et de 79% la teneur totale en DON et en ZEA (Trenholm et al., 1991). Une autre méthode physique simple est régulièrement utilisée consistant à mélanger des grains fortement contaminés avec des grains sains par dilution réduisant alors le taux de contamination des denrées. Cependant cette pratique a été interdite en Europe (Bryden, 2012).

Les procédés thermiques sont également très utilisés. Ainsi, les méthodes d'extrusion associant de fortes températures, de pression et de forces de cisaillement permettent de réduire la concentration de certaines mycotoxines dans la maïs de 50 à 80% (Hameed, 1993).

2. Les méthodes chimiques

Les approches chimiques peuvent compléter ou suppléer les méthodes physiques. Elles sont basées sur l'inactivation des mycotoxines par des processus d'ozonation ou d'ammonisation. L'ammonisation est un procédé largement connu et utilisé dans certains pays d'Amérique, en Europe ou en Afrique contre les contaminations en aflatoxines. Il s'avère fiable et sans risque pour la santé (Norred and Morrissey, 1983). La fumonisine B1 peut également être dégradée par les processus d'ammonisation. Ainsi, Park et al. (1992) montrent que 79% de la fumonisine B1 est détruite dans du maïs contaminée par ammonisation (Park et al., 1992). Cette technique semble également agir sur les trichothécènes. En effet, Young et al. (1986) montrent également qu'une ammonisation du blé contaminé au DON (100%) pendant 18h permet une réduction du niveau de DON (85%) (He et al., 1992).

Mais d'autres procédés chimiques sont également utilisés : l'ozonation, l'utilisation de peroxyde d'hydrogène/bicarbonate de sodium, de bisulfite de sodium, de sucres réducteurs ou encore d'acide citrique. L'ensemble de ces méthodes chimiques sur la décontamination des mycotoxines sont largement décrites (Grenier et al.).

Cependant, ces méthodes n'éliminent pas ou ne dégradent pas entièrement les mycotoxines.

3. Les méthodes d'adsorption et de détoxification biologique

Les nouvelles approches basées sur l'adsorption des mycotoxines et/ou la détoxification biologique ou microbiologique sont récentes et en plein essor. Ces dernières utilisent des additifs tels que des adsorbants qu'ils soient de nature inorganique (argiles, bétonite) ou organique (charbon actif, parois de levures ou de bactéries) ou peuvent utiliser également les microorganismes et/ou enzymes dont l'action se fait directement au sein de l'organisme cible de ces toxines.

3.1. Les adsorbants

Mélangés à l'alimentation, les adsorbants piègent les mycotoxines et limitent ainsi leurs adsorptions au niveau du tractus gastro-intestinal. Il existe deux types d'adsorbants : d'une part les adsorbants inorganiques comprenant les argiles tels que les alluminosilicates de sodium ou les bétonites largement utilisées dans la lutte contre la présence d'aflatoxine, et d'autre part les adsorbants organiques comprenant le charbon actif et les parois de levures ou de bactéries.

. Selon Lindemann et al. (1993) et Schell et al. (1993b), un taux d'inclusion de 0,5% de sodium ou de calcium de bétonite semble être bénéfique dans la restauration des performances de croissance de porcelets en croissance nourrit en présence de 800 ppb d'aflatoxine B1 (Lindemann et al., 1993; Schell et al., 1993). Concernant les trichothécènes, en 1983, Carson et Smith observent une amélioration générale des paramètres de performance et une augmentation de l'excrétion de la toxine T-2 des rats nourris avec une combinaison de toxine T-2 et d'argile minérale contenant de la bétonite (Carson and Smith, 1983).

Parmi les adsorbants organiques, il a été montré que le charbon actif pouvait agir sur le potentiel toxique des trichothécènes. En effet, Galey et al. (1987) ont évalué l'efficacité d'un traitement au charbon actif dans la prévention du décès des rats gavés avec des doses létales de toxine T-2 (8 mg de T-2/kg de pc). Il en est de même pour le DON, Binder et al. (2007) montrant la capacité du charbon actif liée à ce trichothécène (Binder et al., 2007).

Mais les composants de micro-organismes tels que les parois des levures ou des bactéries jouent eux aussi un rôle majeur dans la détoxification des mycotoxines. La plupart sont isolées à partir du sol, de compost, de rumen ou encore ou encore d'insectes. Ils ont été

trié pour leur capacité à dégrader les mycotoxines et/ou leurs effets toxiques (Pedrosa et al., 2010). Récemment, Yiannikouris et al. (2004 ; 2006) ont montré que les principaux composés des parois de levures, les β -D-glucanes ont *in vitro* la capacité d'absorber des mycotoxines en se liant directement à l'aflatoxine B1 et les effets bénéfiques d'une préparation de *Saccharomyces cerevisiae* ont alors été testés sur différentes espèces animales (Yiannikouris et al., 2006). Il a été mis en évidence *in vitro* et *in vivo* la capacité de liaison des glucomannanes de levure pour différentes mycotoxines (Meissonnier et al., 2009; Reddy et al., 2003; Stanley et al., 1993; Stanley et al., 2004). Chez le poulet, Reddy et al. (2003) montrent un effet bénéfique des glucomannanes dans la prévention de l'absorption de la toxine T-2 (Reddy et al., 2003).

Tout comme les levures, d'autres espèces microbiologiques telles que les éléments bactériens ont été étudiés pour lutter contre les effets toxiques de ces mycotoxines. Les peptidoglycanes de parois ou les polysaccharides des bactéries lactiques et des bifidobactéries sont impliqués dans la liaison des mycotoxines évitant ainsi leur adsorption et l'apparition de leurs effets toxiques. En 1998, El-nezami et ses collaborateurs ont étudiés le pouvoir "liant" de 12 souches de *Lactobacillus*. Parmi elles, ils ont montré que les souches de *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) et *L. rhamnosus* LC-705 (DSM 7061) ont la capacité d'éliminer l'aflatoxine B1 suggérant une liaison entre les composés de la surface des bactéries et la toxine (El-Nezami et al., 1998). (Haskard et al., 2001; Peltonen et al., 2001). Des études ont également porté sur l'interaction de souches de *Lactobacillus* face à une contamination aux toxines produites par *Fusarium*, la zéaralénone et son dérivé la zéaralénol (El-Nezami et al., 2002a). Les résultats de cette étude ont montré une liaison d'environ 55% des toxines en présence de deux souches de *L. rhamnosus*. En 2002, El-Nezammi et ses collègues montrent aussi la capacité des souches de *Lactobacillus* et de *Propiobacterium* à éliminer des trichothécènes (DON, 3-acétylDON, NIV, T-2...) (El-Nezami et al., 2002b).

Cependant les capacités de liaison toxines-bactéries ne sont pas les seuls mécanismes pouvant limiter les effets toxiques induits par les mycotoxines. En effet, les micro-organismes peuvent également diminuer l'effet toxique de toxiques ces mycotoxines grâce aux enzymes qu'elles synthétisent.

3.2. La détoxification biologique

La dégradation des mycotoxines par voie enzymatique ou microbiologique repose sur la capacité de nombreux microorganismes (levures, bactéries ou champignons) à biotransformer ou détoxifier les mycotoxines aboutissant à la production de métabolites moins ou non-toxiques. Ainsi, plusieurs microorganismes (levures, bactéries, champignons) ont été recensés d'après leur capacité à inactiver les mycotoxines. En 1966, le premier microorganisme *Flavobacterium aurantiacum* a été isolé par l'équipe de Ciegler comme possédant une activité de détoxification des aflatoxines (Ciegler et al., 1966). D'autres microorganismes ont été isolés tels que la bactérie anaérobie *Phenylbacterium immobile* impliquée dans la dégradation de l'Ochratoxine A (Wegst and Lingens, 1983). Plus récemment, il a été mis en évidence que plusieurs souches bactériennes ont une action de dégradation plus ou moins efficace de l'Ochratoxine A *in vitro* telles que les souches *Lactobacillus* et *Bacillus* (Bohm et al., 2000). Concernant les trichothécènes, un effet de dégradation partielle du nivalénol et du DON a été montré par Styriak et al. (2001) (Styriak et al., 2001). En 2000, une nouvelle souche d'*Eubactérie* référencée BBSH 797 a été isolée à partir du contenu de rumen de bovin montrant un effet significatif sur la baisse de toxicité des trichothécènes (Fuchs et al., 2002).

3.3. Microorganismes et induction de processus biologiques pour contrecarrer les effets des mycotoxines

Outre l'action de ces microorganismes via leurs enzymes, ces microorganismes peuvent également agir sur d'autres processus biologiques pour limiter l'effet de ces contaminants. De nombreux microorganismes dont les bactéries lactiques, principalement du genre *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia coli* strain Nissle 1917 et *Saccharomyces* ont montré des effets bénéfiques sur la santé tels que la prévention et/ou le traitement des diarrhées, des pathologies infectieuses, des allergies et des maladies inflammatoires intestinales (IBD) de façon souche dépendante dans plusieurs études animales ou lors de tests cliniques chez l'homme (Fedorak and Madsen, 2004; Kawase et al., 2009, , 2010; Schultz, 2008; Szajewska et al., 2001; Szajewska and Mrukowicz, 2001). Récemment chez le rat, il a été décrit qu'une ingestion néonatal de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (LR17938)

augmente significativement le pourcentage de Tregs FoxP3⁺ dans l'iléon (Xiao et al., 2008). Ces auteurs ont pu mettre en évidence un effet anti-inflammatoire de cette souche associé à une induction de la migration des Tregs FoxP3⁺ au niveau de l'intestin chez des rats souffrants d'une maladie inflammatoire de l'intestin, la necrotizing enterocolitis (NEC) (Xiao et al., 2008). Smelt et al. (2012) ont également mis en évidence l'impact de plusieurs souches de Lactobacilles sur l'augmentation de la fréquence des cellules Tregs chez des souris saines (Smelt et al., 2012). Une étude récente de Toumi et al. (2013) montre un rôle bénéfique d'une ingestion d'un mélange de bactéries contenant *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *L. plantarum* et *B. breve* sur le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale chez des souris présentant des colites induite de façon expérimentale par le DSS (Toumi et al., 2013). Les effets potentiels d'une autre souche, *Lactobacillus salivarius* SMXD51, a été évalué *in vitro* montrant son effet positif sur les fonctions de barrière intestinale à travers l'augmentation de la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) ainsi que sur d'autres fonctions telles que l'adhérence de cette bactérie aux cellules épithéliales ou encore la stimulation des défenses immunitaires à travers une augmentation d'IL-6, d'IL-8, d'IL-10 et de β -défensine 2 (Messaoudi et al., 2012). Konstantinov et al. (2006) a isolé à partir de l'intestin de porc une nouvelle souche commensale, *Lactobacillus sobrius* 16698T, caractérisée comme Gram+, catalase-, anaérobie et non mobile (Konstantinov et al., 2006). Cette souche bactérienne est également retrouvée chez les végétaux, sur les grains et les produits alimentaires ainsi qu'au niveau du tractus gastro-intestinal humain (Konstantinov et al., 2006). *In vivo*, ces mêmes auteurs montrent en 2008 que la présence de *L. sobrius* 16698T réduit le niveau d'*enterotoxigenic Escherischia coli* (ETEC) dans l'intestin et aide à la croissance des porcelets infectés par cette bactérie pathogène (Konstantinov et al., 2008). Parallèlement à ces observations, Roselli et al, 2007 montrent également un effet protecteur de *L. sobrius* vis-à-vis d'une infection par des ETEC via l'utilisation d'un modèle *in vitro* d'IPEC-1. Les auteurs montrent notamment que *L. sobrius* 16698T a la possibilité de réduire l'adhésion des ETEC et d'inhiber la délocalisation et la réduction du nombre des protéines de jonctions serrées (ZO-1 ou occludines) induites par les ETEC. De plus, cette bactérie commensale a le pouvoir de contrecarrer les effets inflammatoires générés par les ETEC en réduisant notamment l'induction de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 et en favorisant une augmentation de la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Roselli et al., 2007).

OBJECTIFS

Objectifs de la thèse

Les données bibliographiques qui ont été décrites mettent en évidence d'une part l'importance du maintien de l'homéostasie immunitaire au niveau des différentes muqueuses (respiratoire ou intestinale) et d'autre part l'impact des mycotoxines dans la modulation des réponses immunitaires (inflammatoire, humorale ou cellulaire) initiées au sein de l'organisme et ce, même lors d'exposition à de faibles doses comparables à celles retrouvées dans les denrées alimentaires. De nombreux perturbateurs tels que les pathogènes, toxines et autres xénobiotiques sont capables d'altérer le fragile équilibre immunitaire existant au sein de ces muqueuses à travers de multiples mécanismes d'action sur les différentes cibles du système immunitaire. Parmi ces perturbateurs, l'équipe d'immuno-mycotoxicologie au sein de l'unité ToxAlim de l'INRA de Toulouse s'intéresse tout particulièrement aux effets immunomodulateurs de ces mycotoxines au niveau systémique et s'est orientée depuis peu à l'étude de l'impact des mycotoxines au niveau du tractus gastro-intestinal. Les travaux de cette équipe ont montré préalablement que certaines mycotoxines et notamment celles appartenant à la famille des trichothécènes possèdent des propriétés immunomodulatrices. Elles sont à l'origine de l'initiation d'une inflammation chronique (Oswald and Comera, 1998; Oswald et al., 2005; Pinton et al., 2009) ou d'une diminution des marqueurs d'activation des macrophages au niveau systémique (Wache et al., 2009). Parallèlement à ces découvertes, cette même équipe a pu montrer des effets majeurs de certains trichothécènes dont le DON dans l'altération des fonctions de barrière épithéliale (Pinton et al., 2010; Pinton et al., 2011).

Ainsi, dans la continuité de ces travaux, les essais réalisés dans cette thèse ont porté sur l'impact de deux mycotoxines appartenant à la famille des trichothécènes, sur l'homéostasie des réponses immunitaires mise en place au niveau des muqueuses respiratoire et intestinale.

L'hypothèse générale soulevée est qu'un environnement (aérien ou nutritionnel) chargé en trichothécènes pourrait induire une modulation des réponses immunitaires inflammatoires, première ligne de défenses de l'hôte en cas d'agression. Ces défenses immunitaires sont initiées par les cellules immunocompétentes présentes au niveau de ces différentes interfaces (milieu extérieur/hôte). En conséquence, il semblerait que les effets

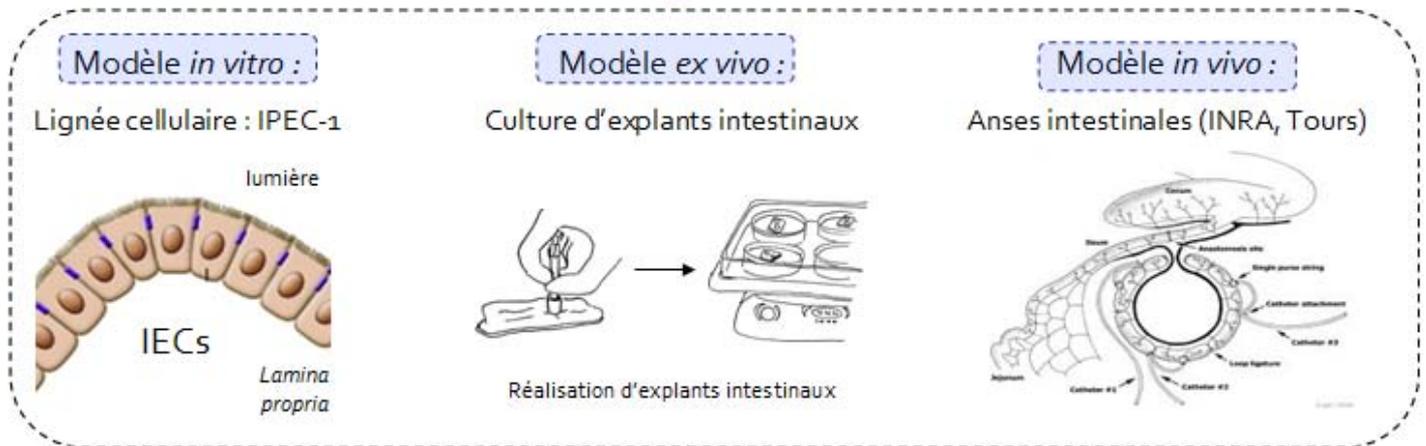
immunomodulateurs des trichothécènes peuvent être à l'origine : 1/ d'une sensibilité des animaux aux infections bactérienne, virale ou fongique ; 2/ de la diminution de l'efficacité vaccinale et thérapeutique ou encore 3/ d'une réactivation des infections. Aujourd'hui, il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces composés sur les différents acteurs immunitaires responsable de l'homéostasie au sein de ces muqueuses afin d'établir des liens plus précis entre exposition mycotoxique et immunosuppression. Pour répondre à ces hypothèses, une exposition à ces deux toxines issues de la famille des trichothécènes : **le déoxynivalénol et la toxine T-2**, sur différents modèles *in vitro* (lignées cellulaires ou de culture de cellules primaires), *ex vivo* (explants intestinaux) et *in vivo* (gavage des porcs avec du DON) a été entreprise. A l'aide de ces modèles, trois études seront présentées dans la partie travail expérimental. Trois objectifs distincts ont alors été posés :

1°) **Objectif 1** : Dans le cadre d'une pré-exposition de la muqueuse respiratoire à de faibles doses de toxine T-2, l'objectif était de déterminer si cette toxine était capable d'altérer l'activation des macrophages connus pour être des médiateurs importants dans la mise en place d'une réponse inflammatoire. Dans ce but, l'effet d'une pré-exposition à la toxine T-2 sur des macrophages alvéolaires primaires porcins (PAM) activés par les différents agonistes des TLRs a été étudié. La figure 23 présente la démarche expérimentale mise en place pour répondre à ce premier objectif.

vivo d'explants intestinaux puis de tenter de comprendre et de décortiquer les mécanismes induits par ces toxines à l'aide de différents modèles cellulaires et outils méthodologiques: l'analyse transcriptomique de lignée de cellules épithéliales (IPEC-1), la capacité de maturation des cellules dendritiques dérivées de monocytes, et le phénotypage de sous-populations de lymphocytes issus de PBMCs. La figure 24 présente la démarche expérimentale mise en place pour répondre à ce second objectif.

ETAPE 1 : Etude de l'effet du DON sur l'immunité intestinale

Exposition à 10 µM de DON ≈ 3 mg de DON/Kg d'aliment



- ↳ Analyse transcriptomique des gènes impliqués dans les réponses immunitaires par qPCR: (Inflammatoire, Th1, Th17 et Tregs)
- ↳ Analyse protéomique des cytokines impliquées dans les réponses immunitaires par ELISA (Inflammatoire et IL-17)
- ↳ Analyse phénotypique des Tregs par cytométrie en flux

ETAPE 2 : Comparaison des effets immuno - modulateurs entre le DON et la toxine T-2 sur les différents acteurs modulant l'homéostasie intestinale

Exposition à 10 μ M de DON ou à 3 nM de toxine T-2

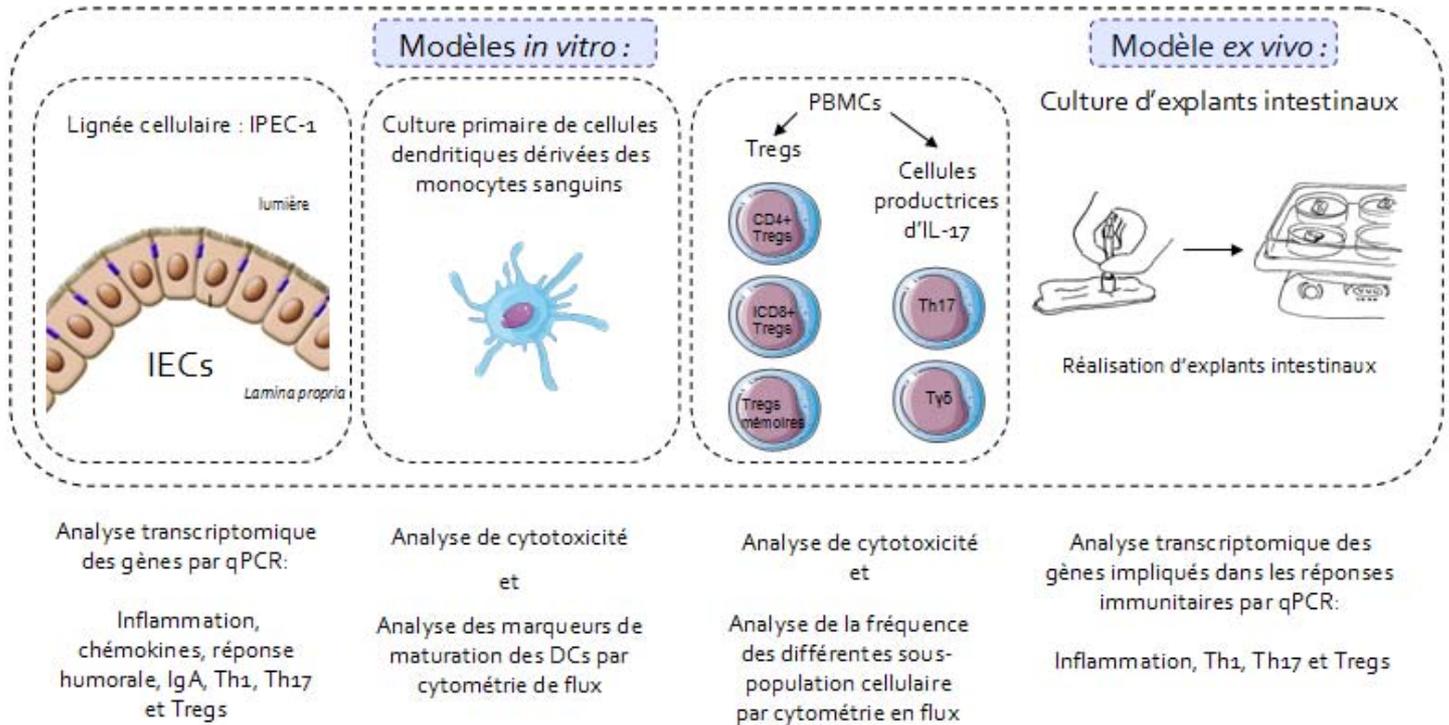
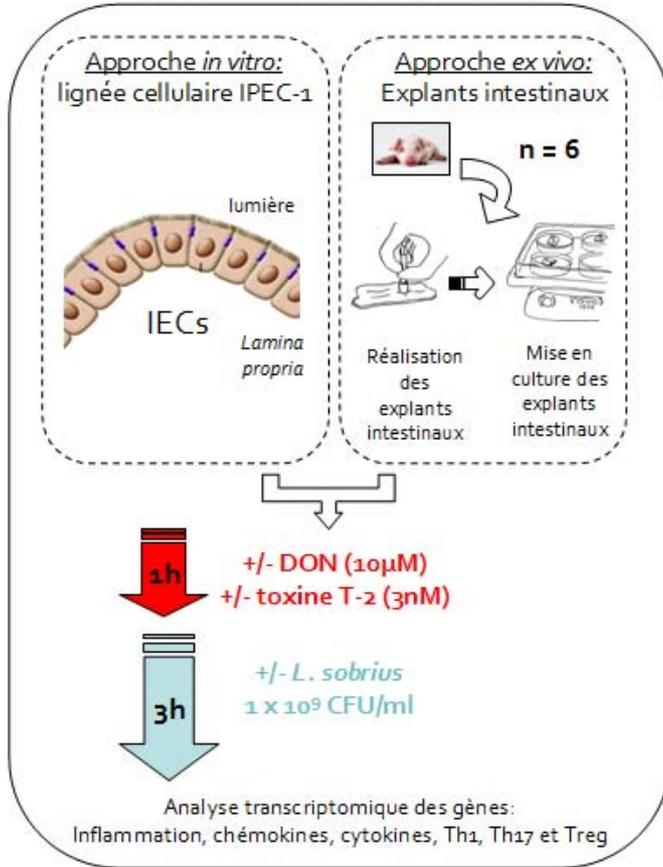


Figure 24 : Démarche expérimentale mise en place pour répondre à l'objectif 2

3°) **Objectif 3 :** Le but de cette troisième partie de travail de doctorat a été de déterminer si *Lactobacillus sobrius* DSM 16698T pouvait avoir un effet bénéfique vis-à-vis d'une pré-exposition intestinale à nos deux mycotoxines d'intérêt. La figure 25 présente la démarche expérimentale mise en place pour répondre à ce dernier objectif.

Les effets bénéfiques de *L. sobrius* vis-à-vis d'une pré-exposition aux trichothécènes ont été testés sur deux fonctions biologiques différentes :

A. Sur les réponses immunitaires



B. Sur la barrière épithéliales intestinales

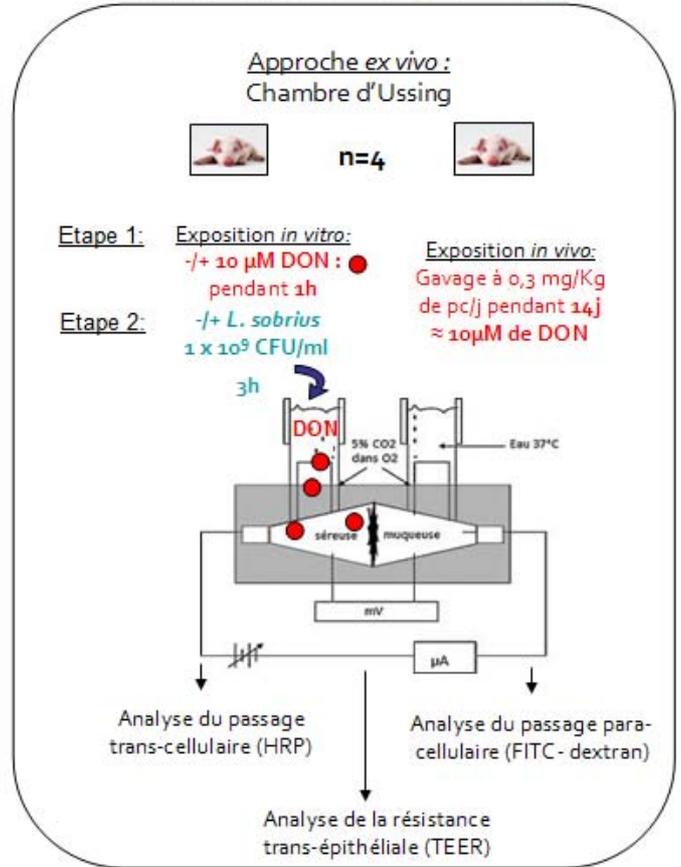


Figure 25 : Démarche expérimentale mise en place pour répondre à l'objectif 3

Lire la seconde partie de la thèse