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 « rebooster » 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 rappellerais 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'orthographes.

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 revèle : 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 passées 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 infaillible 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 (LTγδ) 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, *Lactobacillus sobrius 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 : Caractériques 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 Tαβ 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 lymphoïdesinnées (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 messager	messenger ribo-nucleic acid
ATA:	Aleucie toxique alimentaire	Aleucia Toxic Alimentary
BALT:	Tissu lymphoïde associé aux bronches	Bronchus-associted lymphoïd 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 dendrictiques 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 Expérimentalis
FoxP3:	Forkhead-box protein 3	Forkhead-box protein 3
GALT:	Tissu lymphoïde associé à l'intestin	Gut-associted lymphoïd 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	Inflamatory bowel diseases
Id2:	Inhibiteur du site de liaison à l'ADN-2	Inhibitor of DNA binding-2
IFN-:	Interféron-	Interferon-
Ig-:	Immunoglobuline-	Immunogobulin-
IL-:	Interleukine-	Interleukin-
IL-17R:	Récepteur à l'interleukine 17	Interleukin-17 receptor
ILC(s):	Cellule(s) lymphoïde(s) innée(s)	Innate lymphoïd cell(s)
IPEX:	Immuno-dérégulation Poly-endocrinopathie	Immune-Dysregulation Poly-endocrinopathy
	Entéropathie auto-immune liée au chromosome X	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-associted lymphoïd tissue
MAPK:	Mitogens-associated proteins kinase	Mitogens-associated proteins kinase

M-CSF:	Facteur stimulant les colonies monocytaires	Monocyte Colony Stimulating Factor
	Français	Anglais
MHC-:	Complexe majeur d'histocompatibilité	Major of Histocompatibility Complex
MoDC(s):	Cellule(s) dendritique(s) dérivée(s) des monocytes	Monocytes-derived dendritic cell(s)
mTreg(s):	Cellule(s) T régulatrice(s) mémoire(s)	memory regulatory T cell(s)
MyD88:	Myeloid Differentiation primary response gene (88)	Myeloid Differentiation primary response gene (88)
NF-KB:	Facteur nucléaire-κB	Nuclear Factor-κB
NKT:	Cellules T naturellement tueuses	Natural killer T
NO:	Monoxyde d'azote	Nitric oxide
nTreg(s):	Cellule(s) T régulatrice(s) naturelle(s)	Natural regulatory T cell(s)
PAMP(s):	Motif(s) moléculaire(s) associé(s) aux pathogènes	Pathogen associated molecular pattern(s)
PBMC(s):	Cellule(s) mononucléé(s) du sang périphérique	Peripheral blood mononuclear cells
PRR(s):	Récepteurs de reconnaissances de motifs antigéniques	Pattern-recognition receptor(s)
RA:	Acide rétinoïque	Retinoic acid
RALDH:	Rétinaldéhyde déhydrogenases	Retinaldehyde dehydrogenases
RAP:	Polyarthrite rhumatoïde	Rhumatoïd Polyarthrite
ROR-:	Récepteur retinoic acid-related orphean	Retinoic acid-related orphean receptors
STAT3:	Tranducteur de signal et activateur de transcription 3	Signal transducer and activator of transcription 3
SWC-:	Cluster de différenciation porcin-	Swine workshop cluster-
T-2:	Toxine T-2	T-2 toxin
t-bet:	Facteur de transcription de la boîte T	T box transcription factor
TCR-:	Récepteurs des cellules T	T cells receptor
TGF-β:	Facteur transformant de croissance -beta	Transforming Growth Factor – beta
Th:	Cellule T helper	T helper cell
TIR:	Récepteur Toll/Interleukine-1	Toll/IL-1 receptor
TLR(s):	Récepteur(s) Toll-like	Toll-like receptor(s)
TNF:	Facteur de nécrose tumorale	Tumor Necrosis Factor
Tr1:	Cellule T régulatrice de type 1	T regulatory cell type 1
Treg(s):	Cellule(s) T régulatrice(s)	T regulatory cell(s)
TSLP:	Protéine lymphoïde stromale thymique	Thymic stromal lymphoïd protein
UC:	Colite ulcérative	Ulcerative colitis

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-1β 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 Tγδ 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 worldwild 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-1β 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 cytokin associated to the IL-17 pathway. This cytokine is produced by one of the subpopulations of Tregs, the **Tγδ 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 trichothecen 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 trichothecens 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 8èmes 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'issu 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) .

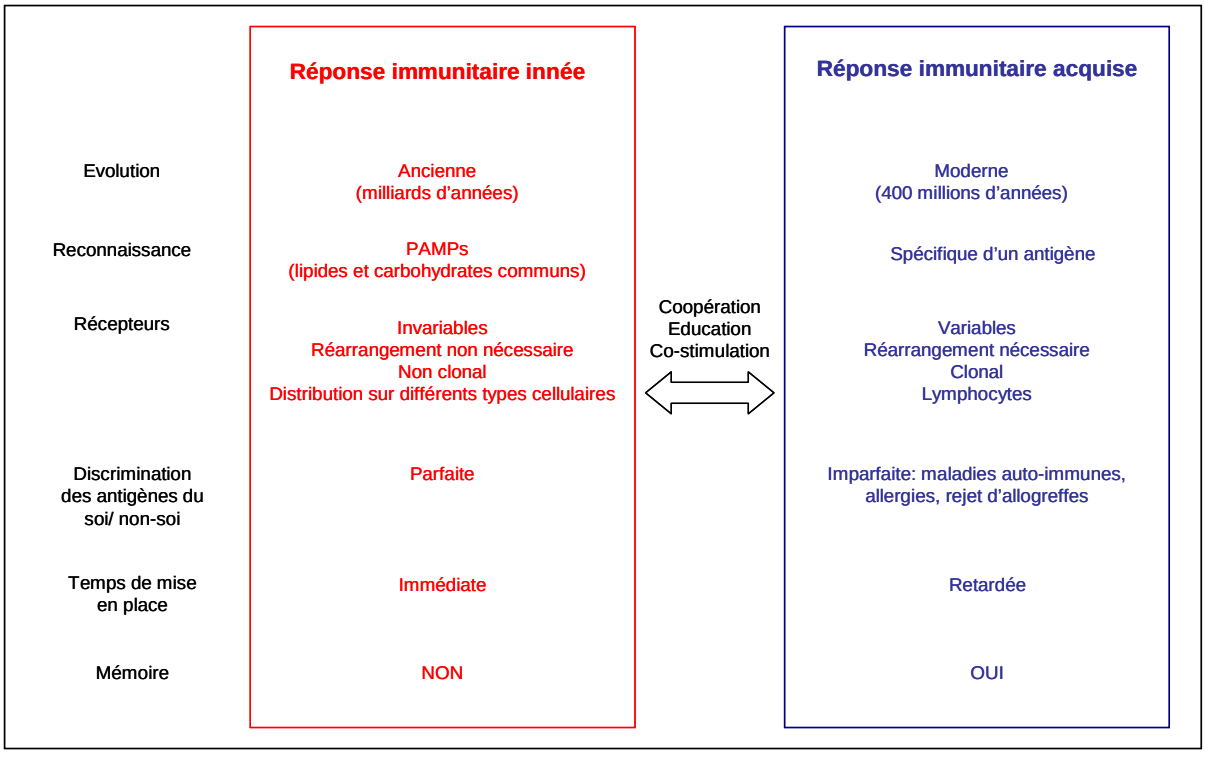
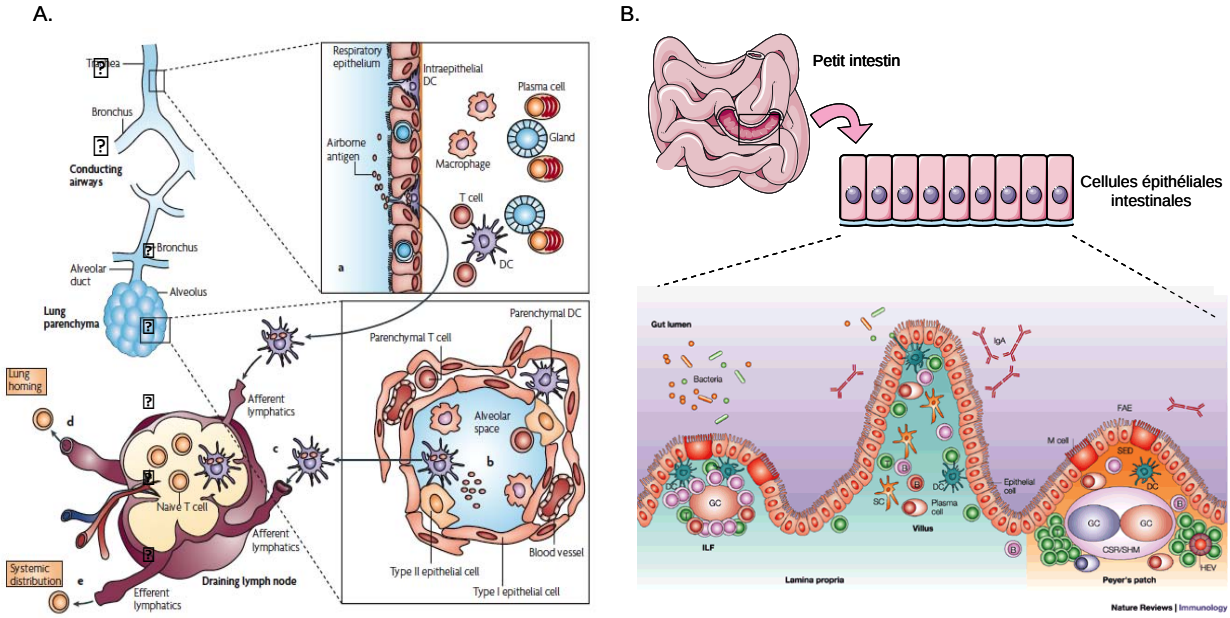


Figure 1 : Caractériques principales des réponses immunitaires innée et acquise selon McGuinness D.H. et al. (2003)

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 homéostasique. 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° 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).



Holt PG et al., 2008

D'après Fagarasan, S. and Honjo, T., 2003

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

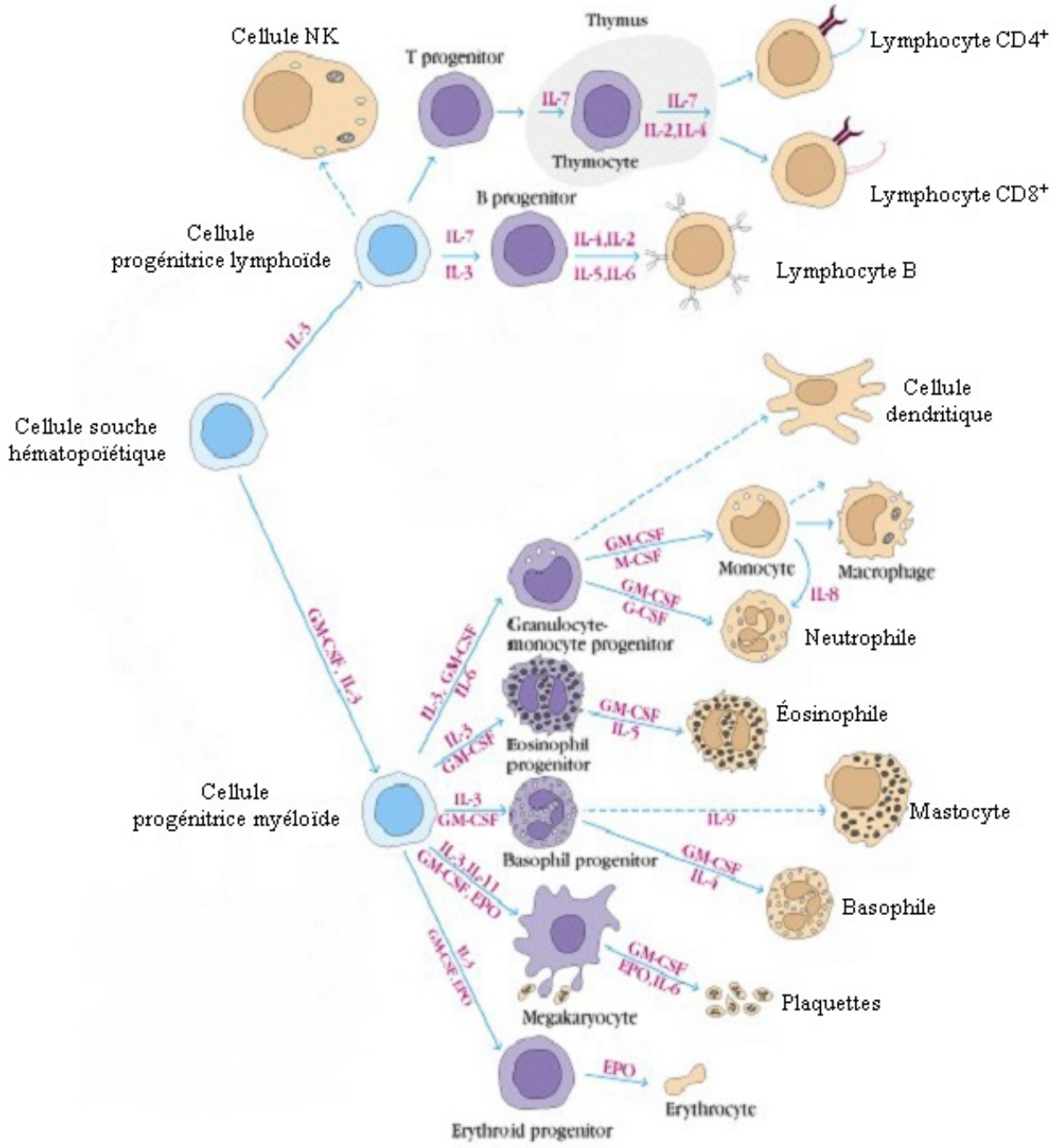


Figure 3: Ontogénèse des cellules de l'immunité

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** (Peaudecerf 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-1α/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 (NPTr) 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-1α et l'IL-1β. 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 (Krzesicki et al., 1997), les DCs (Ghanekar et al., 1996) et les macrophages (Brody and Durum,

1989). *In vitro,* IL-1α 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 élimination les cellules épithéliales infectées ou endommagées (Goto and Ivanov, 2013) (Figure 4A).

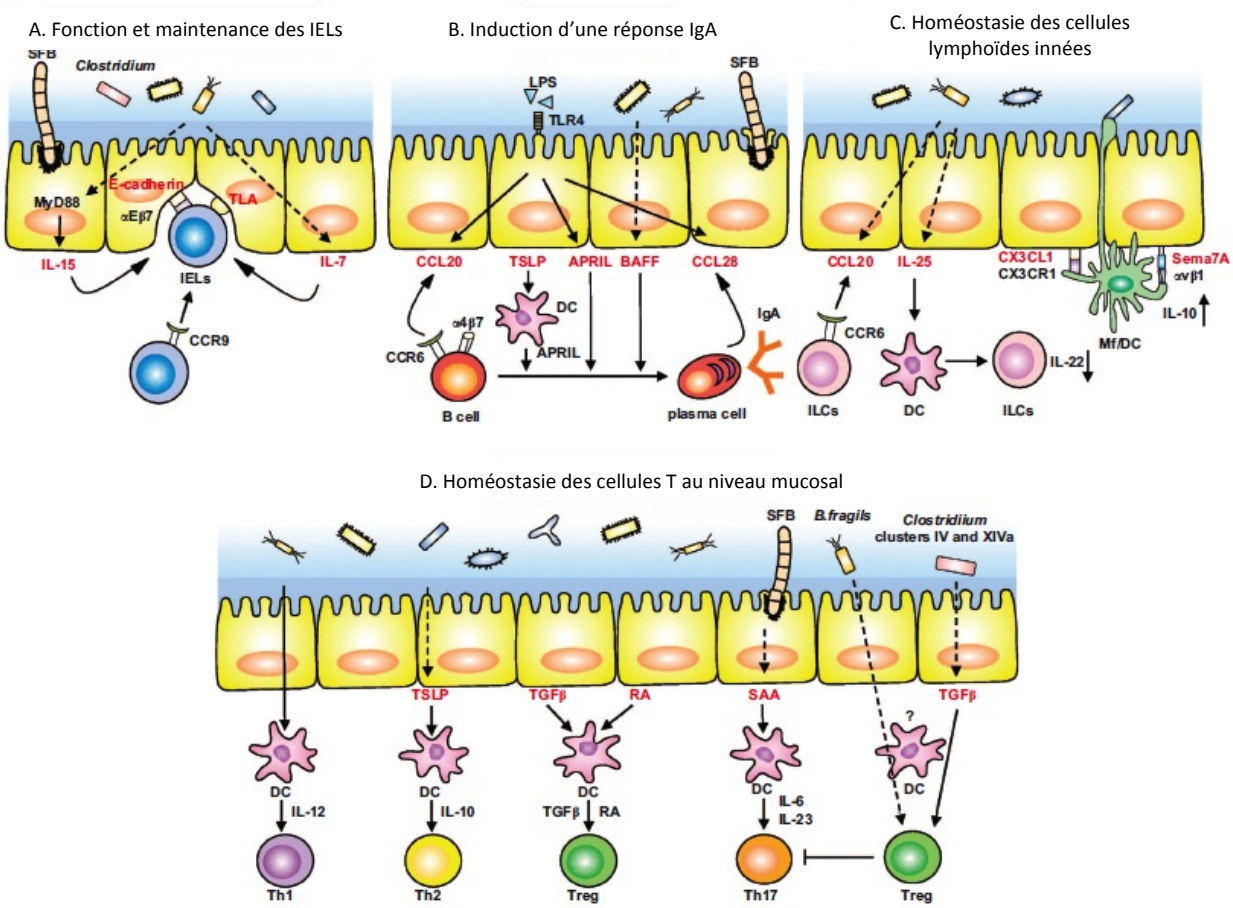


Figure 4: Cellules épithéliales et sécrétions pouvant influencer la réponse immunitaire (Goto and Ivanov, 2013)

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-3α) 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-1α/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 régulatrices (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 mucosale 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 régulatrices** (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-prolifération 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 α4β7 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 orphean receptor (ROR)γt**, 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-1β, TNF- α	Action pro-inflammatoire et contribue à la différenciation des Th17	Macrophages et DCs	(Feldmann and Saklatvala, 2004)
	IL-1α	Action pro-inflammatoire = recrutement des cellules immunitaires (DCs, macrophages, LT, NKT, polynucléaires),		(Krzesicki et al., 1997) (Brody and Durum, 1989) (Ghanekar et al., 1996)
	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		(Huston and Liu, 2006) (Jiang et al., 2006; Lee et al., 2008)
	IL-10	Action anti-inflammatoire et participe en combinaison avec TGF-β à la différenciation des Tregs	macrophages, DCs, Th17, Tregs	
	TGF-β	Contrôle l'activation et la différenciation des cellules Tregs et Th17	macrophages, DCs, Tregs	
	IL-6	Participe en combinaison avec TGF-β à la différenciation des Th17	Monocytes/macrophages, DCs, mast cells, LB et T, cellules tumorales, kératinocytes	
	BAFF	Intervient dans la prolifération, différenciation, maturation et survie des LB		(Batten et al., 2000; Schneider et al., 1999)
	APRIL	Fonction similaire à BAFF et intervient dans le changement de classe des IgA		(Litinskiy et al., 2002)
Chémokines	CXCL8 ou IL-8	Chémoattractante pour les PNN et lymphocytes TCD4$^+$ T CD8$^+$	Macrophages et DCs	(Proud and Leigh, 2011)
	CCL20	Chémoattractante pour les lymphocytes B et T CCR6$^+$		(McDonald et al., 2007; Sonnenberg et al., 2011)
	CX3CL1	Recrutement des cellules mononuclées CX3CR1$^+$ (DCs, macrophages, cellules T, cellules NKT)		(Fujimoto et al., 2001) (Farache et al., 2013)
Autre	Acide rétinoïque	Cofacteur des Tregs, inhibition de la différenciation des Th17	Cellules épithéliales intestinales	

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 hématopoiétiques 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** (Granolocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) et le **M-CSF** (Monocyte-Colony Stimuling Factor) (Bugarski et al., 2007). Au cours de cette différenciation, ces monocytes acquièrent de nouveaux récepteurs membranaires notamment le MHCII (Complexe Majeur d'Histocompatilité 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**.**

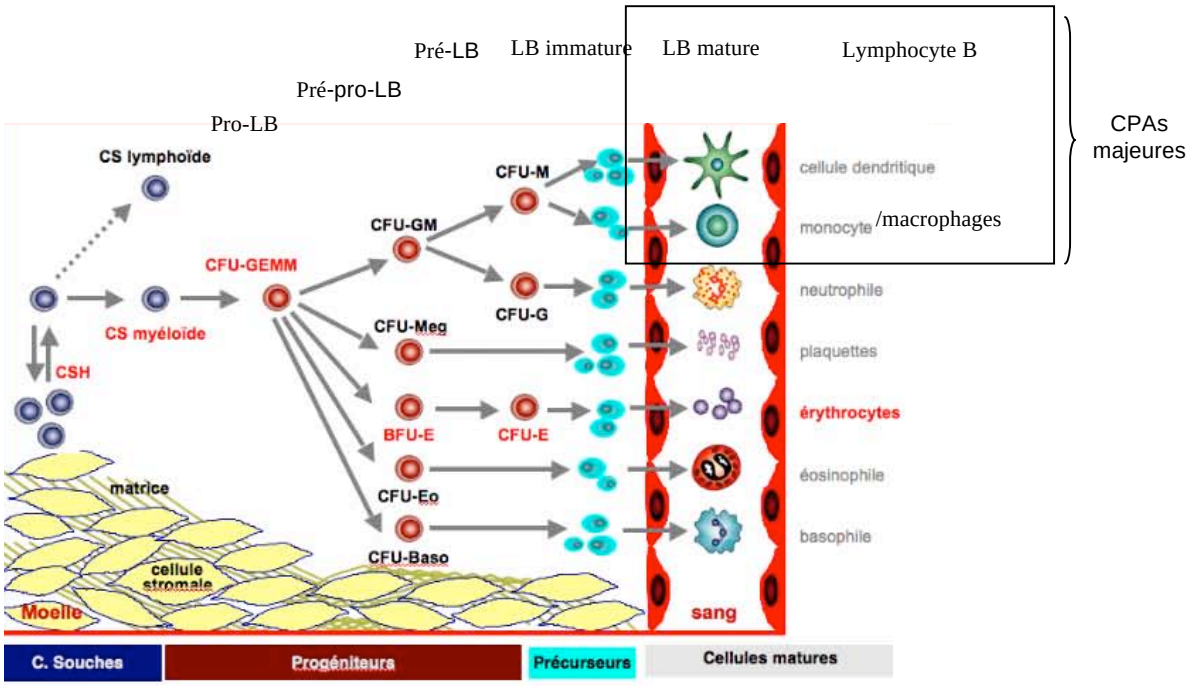


Figure 5: Ontogénèse des cellules présentatrices de l'antigène (CPAs)

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 différencient des macrophages qui l'expriment faiblement (Gordon and Taylor, 2005). Le **CD172a** ou SIRPα 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; Ezquerra 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 (Ezquerra 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 diffèrent 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; Ezquerra 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	low (P), + (H)	low (P), + (H)	low (P), + (H)	low (P), + (H)	(Gordon and Taylor, 2005)
SWC3A (SIRP-α ou CD172A)	High (P)(H)(S)	High (P)(H)(S)	High (P)(H)(S)	High (P)(H)(S)	(Chamorro et al., 2005) (Ezquerra et al., 2009) (van Rijt et al., 2005)
Marqueurs de maturation					
MHC II	+ (P), ++ (H)	+ (P), ++ (H)	+ (P), ++ (H)	+ (P), ++ (H)	(Laskin et al., 2001)
CD16	+ (P), + (H)	+ (P), + (H)	+ (P), + (H)	+ (P), + (H)	(Stout and Suttles, 2004)
Intégrines					
CD11a	++ (H)	++ (H)	++ (H)	++ (H)	(Ezquerra et al., 2009)
CD11b	+ (P)(H)(S)	- (P)	High (S)	- (S), + (H)	(Plantinga et al., 2010)
CD11c	High (P), +(H)(S)	High (P), +(H)(S)	High/low (P), +/-(H)	High/low (P), +/-(H)	(Summerfield and McCullough, 2009)
CD103 (αEβ7)	+ (S)	ND	+ (S)	+ (S)	(Scott et al., 2011)
Récepteur aux chémokines					
CX3CR1	High (H)	+ (H)	High (H), + (S)	+ (H)	(Jung et al., 2000)
CCR6	+ (H)	+ (H)	+ (H)	+ (H)	(van Rijt et al., 2005)
autres					
CD163	High (P), + (H)	High (P), + (H)	ND	ND	(Hiraoka et al., 2005)
SWC9	ND	ND	ND	ND	(McCullough et al., 1997)
SWC1	ND	ND	ND	ND	(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 (Ezquerra 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 $O2^{-\bullet}$ et le monoxyde d'azote NO composés extrêmement toxiques pour les bactéries, les parasites intracellulaires et les cellules tumorales. La myélopéroxydase, 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'IL1-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'IFNγ, les macrophages sécrètent des quantités très importantes de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, 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-1β 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 TNFα, 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-1β (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-1β 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).

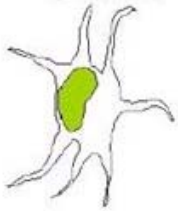
Changements	CD immatures	CD matures
		
Morphologie	Pas de prolongements cytoplasmiques	Apparition de longs prolongements cytoplasmiques qui favorisent les contacts avec les T naïfs
Localisation	Tissus périphériques	Organes lymphoïdes
Capture d'antigène	Oui	Non
Reconnaissance de pathogènes	Forte expression 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 secréter 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 reconnaitre de nombreux motifs d'origine bactérienne, fongique, virale ou certains antigènes de l'hôte (par exemple Heat-shock portein 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).

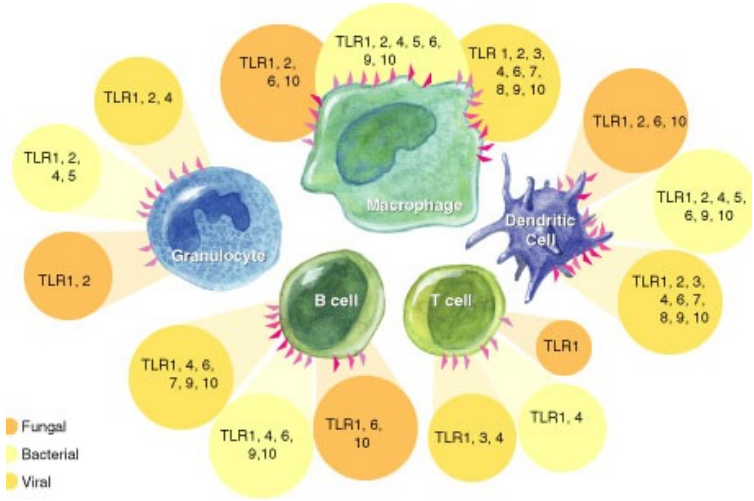


Figure 7: Expression des TLRs en fonction du type cellulaire

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.

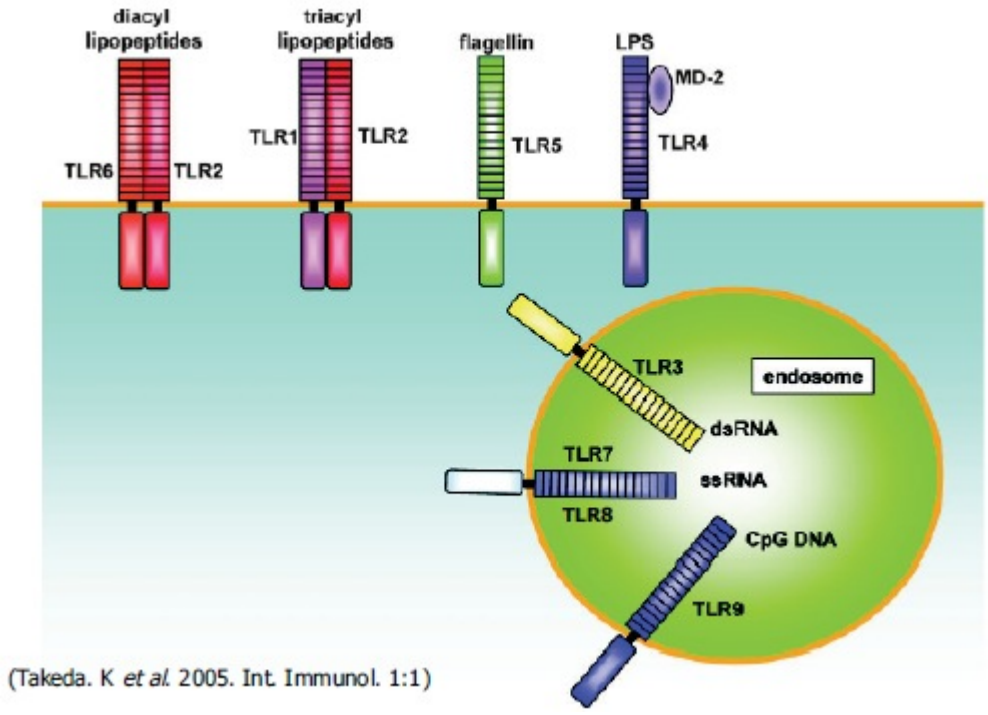


Figure 8: Structure et localisation des TLRs au sein d'une cellule (Takeda K. et al., 2005)

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 exempts 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	*Mycoplasma*	TLR6/TLR2
Triacyl lipopeptides	Bacteria and mycobacteria	TLR1/TLR2
LTA	Group B *Streptococcus*	TLR6/TLR2
PG	Gram-positive bacteria	TLR2
Porins	*Neisseria*	TLR2
Lipoarabinomannan	Mycobacteria	TLR2
Flagellin	Flagellated bacteria	TLR5
CpG-DNA	Bacteria and mycobacteria	TLR9
ND	Uropathogenic bacteria	TLR11
Fungus		
Zymosan	*Saccharomyces cerevisiae*	TLR6/TLR2
Phospholipomannan	*Candida albicans*	TLR2
Mannan	*Candida albicans*	TLR4
Glucuronoxylomannan	*Cryptococcus neoformans*	TLR2 and TLR4
Parasites		
tGPI-mutin	*Trypanosoma*	TLR2
Glycoinositolphospholipids	*Trypanosoma*	TLR4
Hemozoin	*Plasmodium*	TLR9
Profilin-like molecule	*Toxoplasma gondii*	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 liées aux **mitogen-associated protein kinase** (MAPK) et au **nuclear factor-kappa B** (NF-κB) 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-1β sont quant-à elles produites généralement lors de l'activation de la voie NF-κB (Akira, 2009; Kawai and Akira, 2009) (Figure 9).

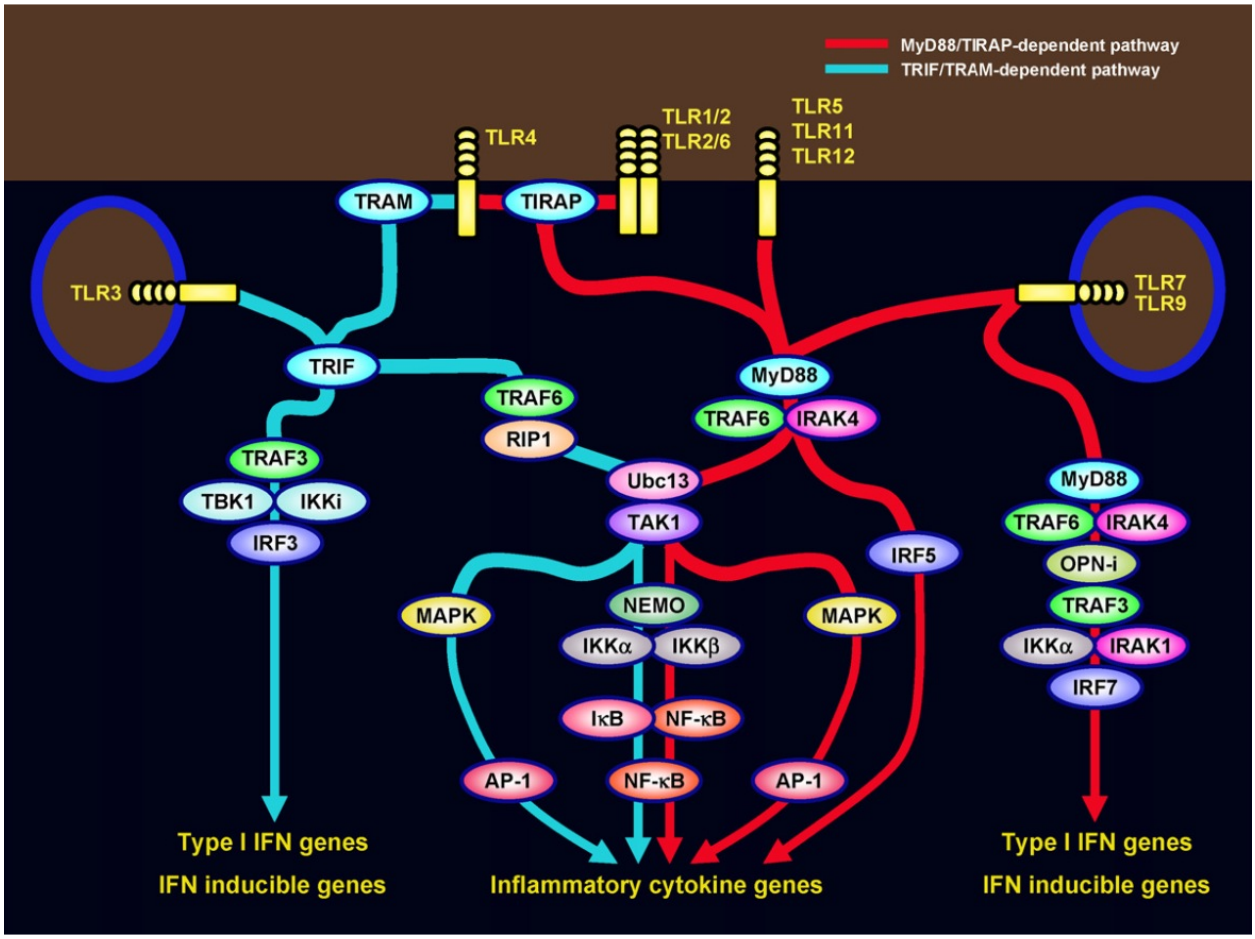


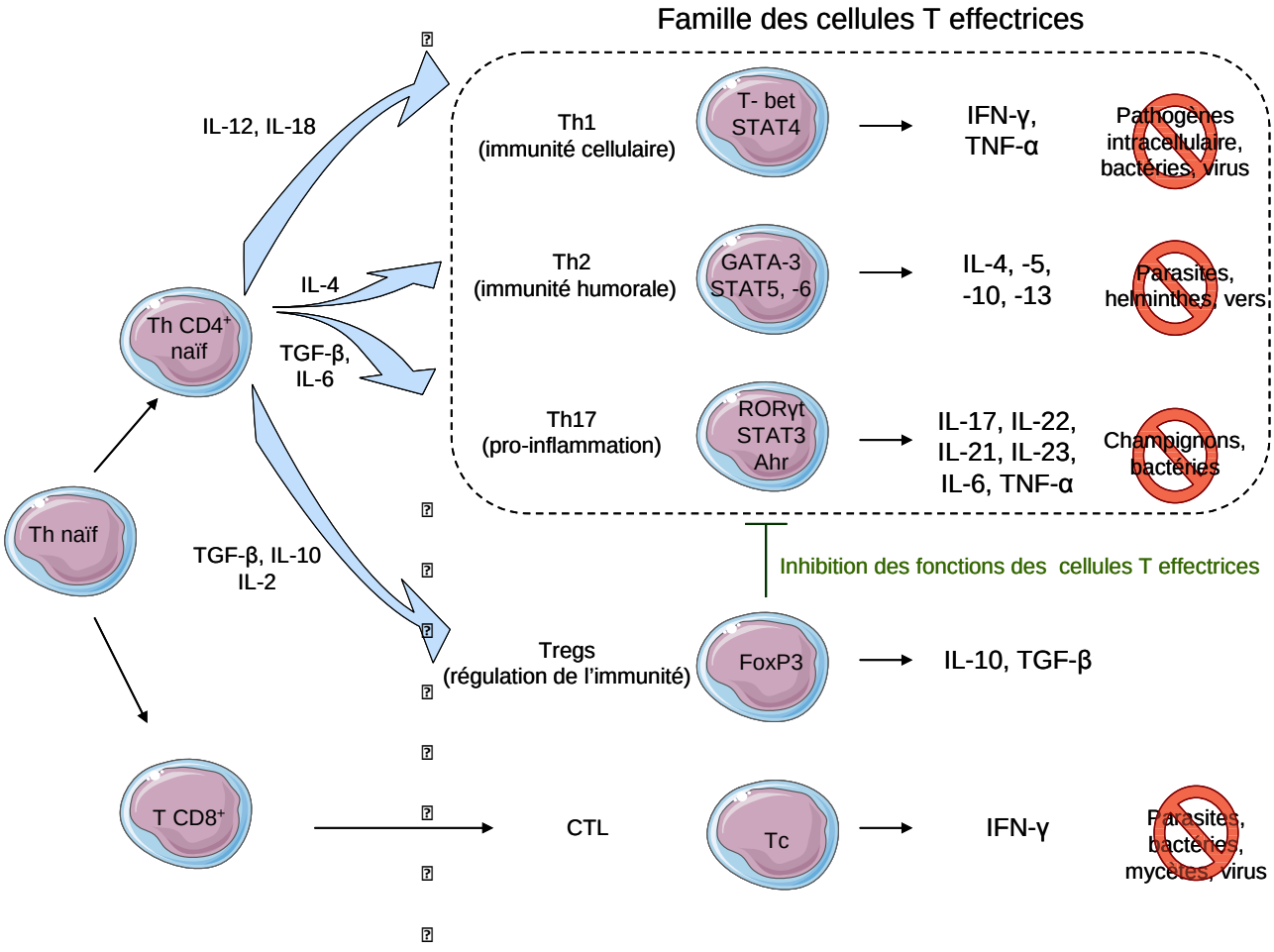
Figure 9: Différentes voies de signalisation induites par l'interaction TLR - TLR-ligand (Kawai and Akira, 2009)

La reconnaissance entre un PAMP et son PRR constitue la première étape de la mise en place d'une réponse immune 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 CPAs (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 **TCRαβ** et le **TCRγδ**.

Les lymphocytes Tαβ 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).


Famille des cellules T effectrices
IL-12, IL-18
IL-4
TGF-β, IL-6
Th CD4+ naïf
Th naïf
TGF-β, IL-10 IL-2
Th1 (immunité cellulaire)
T- bet STAT4
IFN-γ, TNF-α
Pathogènes intracellulaire, bactéries, virus
Th2 (immunité humorale)
GATA-3 STAT5, -6
IL-4, -5, -10, -13
Parasites, helminthes, vers
Th17 (pro-inflammation)
RORγt STAT3 Ahr
IL-17, IL-22, IL-21, IL-23, IL-6, TNF-α
Champignons, bactéries
Inhibition des fonctions des cellules T effectrices
Tregs (régulation de l'immunité)
FoxP3
IL-10, TGF-β
T CD8+
CTL
Tc
IFN-γ
Parasites, bactéries, mycètes, virus

[illegible]

[illegible]

[illegible]

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-1β,

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-inflammatrices 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).

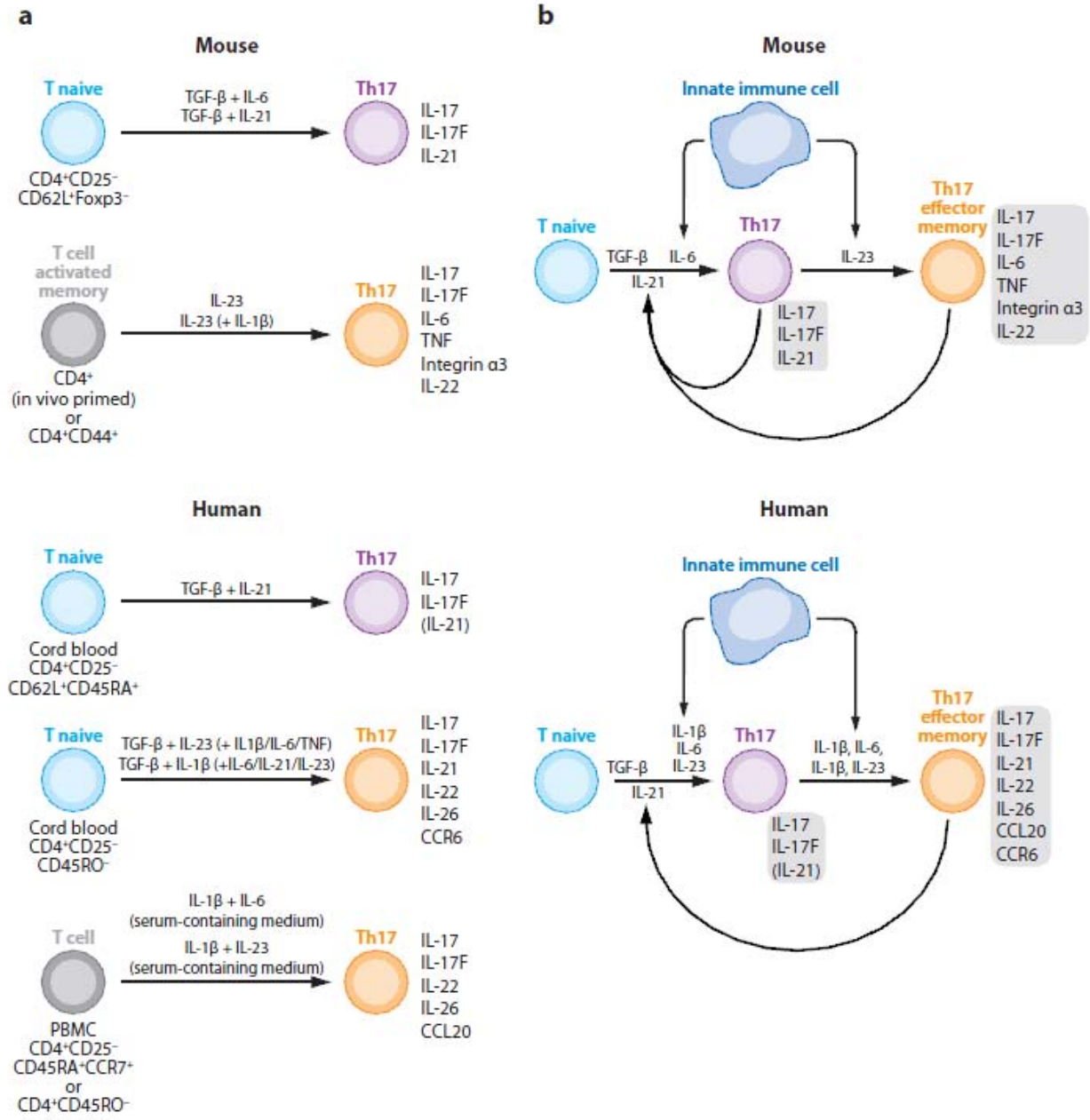


Figure 11: Différenciation des lymphocytes Th naïves en Th17 selon le modèle souris (A) ou le modèle humain (B) : Implication de l'environnement cytokinique

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-1β** 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-1β 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 orphean** (**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).

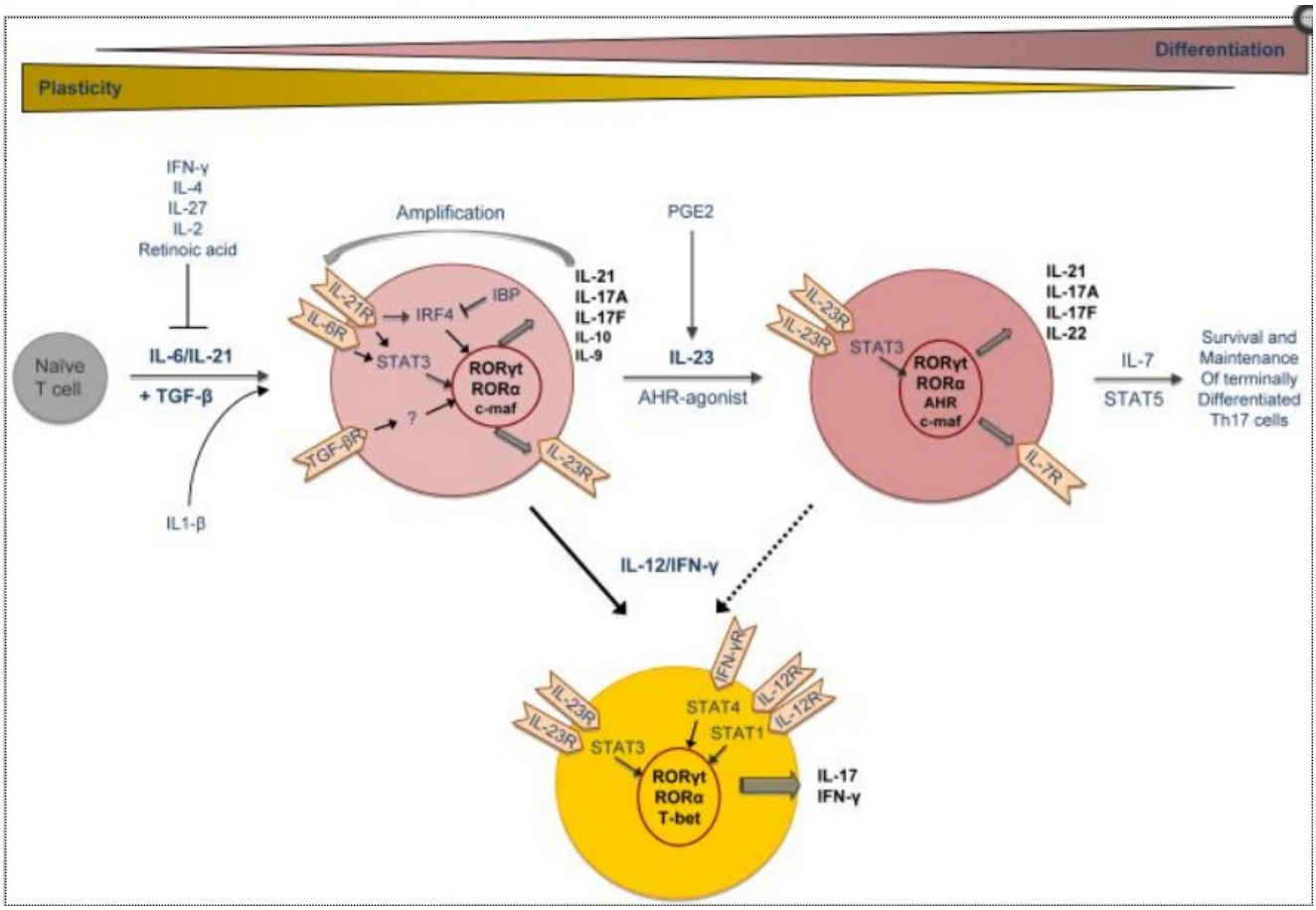


Figure 12: Différenciation des lymphocytes Th naïves en Th17 : Implication des facteurs de transcription

Les récepteurs retinoid acid-related orphean (RORs) appartiennent à une famille bien distincte de récepteurs nucléaires et regroupent les récepteurs ROR alpha (α), béta (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, **RORα** et **RORγt**. RORγt 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 RORγt, les cellules productrices d'IL-17 ne sont pas absentes. RORα et RORγt 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 RORγt 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 RORγt 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 RORγt (Crome et al., 2009). Par exemple, la flagelline, récepteur du TLR-5, est connue pour moduler l'expression d'AhR et induire RORγt. 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-1β, 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 transcrit 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) (Uhlig 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	- 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	- 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	- 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	- 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 sécrèter 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 Tγδ 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+αβTCR+ Th17	IL-17, IL-17F, IL-22	IL-6, TGF-β, IL-1β, IL-23	RORγt, RORα, AhR, IRF-4
CD4+αβTCR+ nTh17	IL-17, IL-17F, IL-22	IL-6, TGF-β	RORγt
CD1d-tetramer+ NK1.1 – CD4-	IL-17	TGF-β	RORγt
Cellules IL-17+ iNKT	IL-17		
CD27 – γδTCR+	IL-17	TGF-β	RORγt
Cellules T IL-17+ γδTCR+	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 RORγt et le récepteur à l'IL-7 (IL-7Rα 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'IFNγ 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 RORγt et/ou AhR qui favorisent la différenciation de ces ILCs précurseurs en ILC17 et ILC22 (Cherrier et al., 2012) (Figure 13).

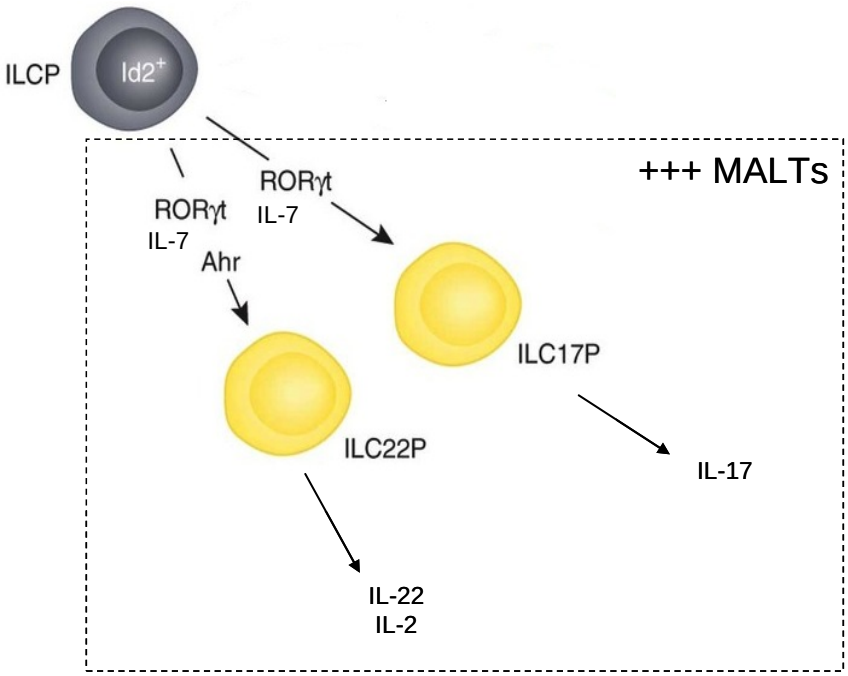


Figure 13: Différenciation des cellules lymphoïdesinnées (ILCs) et sécrétions associées (d'après Spits and Di Santa, 2010)

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 rodentrium*, 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 RORγt 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 distinguent 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 (LTγδ)

Les lymphocytes Tγδ 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 Tγδ 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 LTγδ sont considérés comme des cellules appartenant à l'immunité innée éliminant les pathogènes et produisant des molécules anti-virales.

Les cellules Tγδ 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 Tγδ 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 Tγδ. En effet, l'IL-1α ou IL-1β, en synergie avec IL-23, ont un rôle essentiel dans l'induction de la production de l'IL-17 par les cellules Tγδ (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 Tγδ

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 Tγδ productrices d'IL-17 (Nurieva et al., 2007).

Les cellules Tγδ productrices d'IL-17 constituent l'une des deux sous-populations de cellules Tγδ (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 Tγδ 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 Tγδ producteur d'IFN-γ et expriment t-bet (facteur de transcription des Th1) alors que les cellules $CD27^-$ Tγδ expriment RORγt (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 Tγδ (Lochner et al., 2008). D'autres récepteurs de surface que le CD27 sont associés aux cellules Tγδ productrices d'IL-17 incluant le CD127 (IL-7R) et CCR6 (Dirix et al., 2009).

Ainsi les cellules Tγδ 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 Tγδ 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 Tγδ, sont également présentes dans les nœuds lymphatiques et la peau (Sutton et al., 2012). Leur stimulation est également induite par l'IL-1β 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 Tγδ 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 ulcératives) (Figure 14).

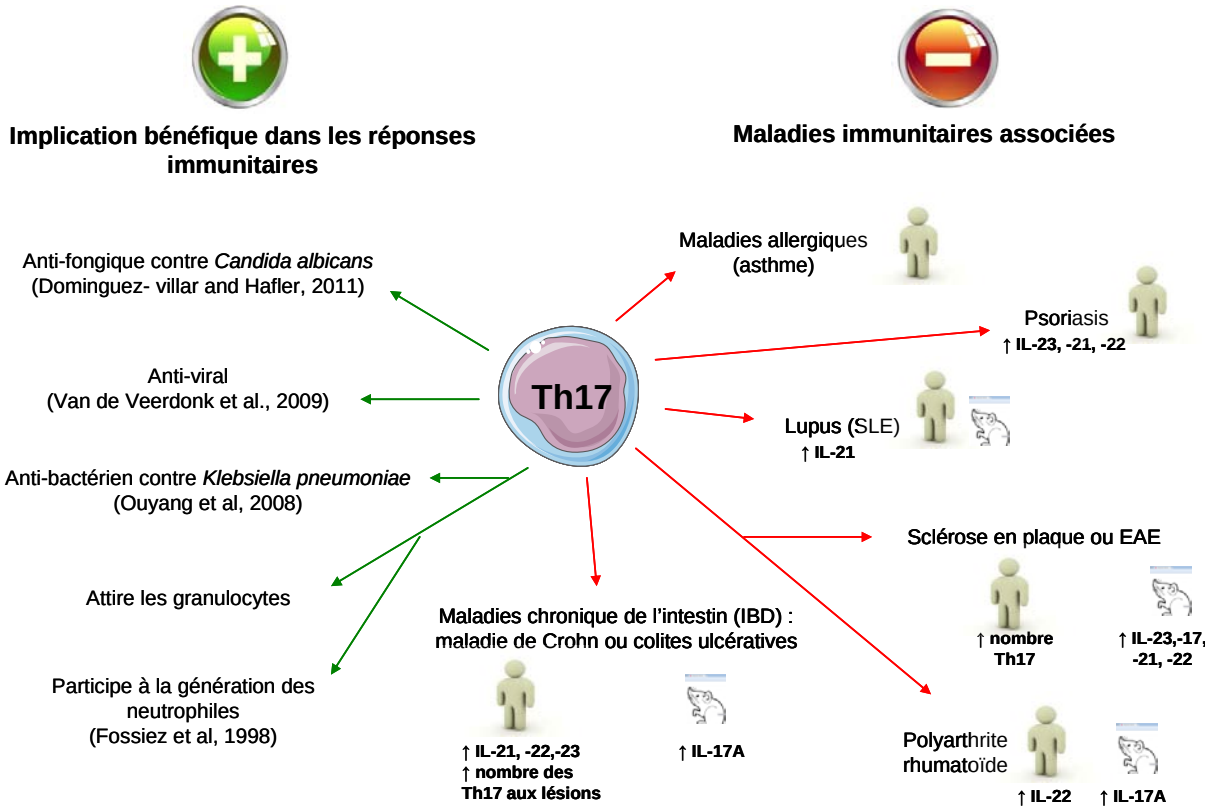


Figure 14: Les cellules Th17 et leurs implications dans les réponses immunitaires

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 ulcérative** (**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 voit 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 CPAs 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.

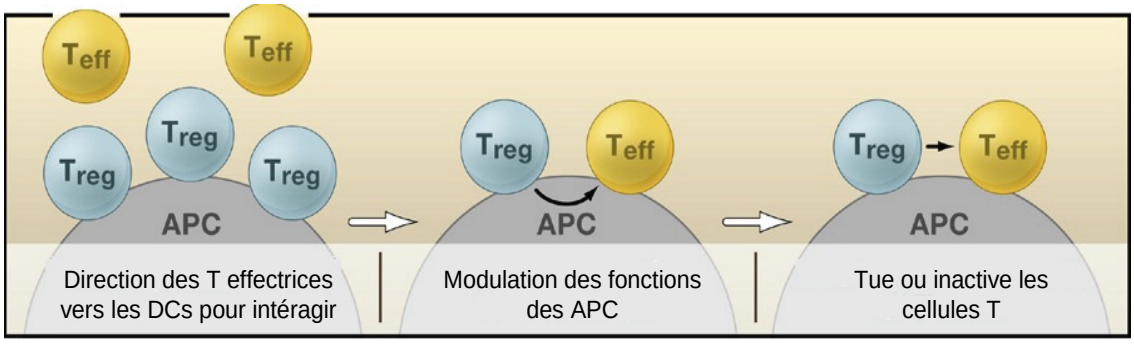


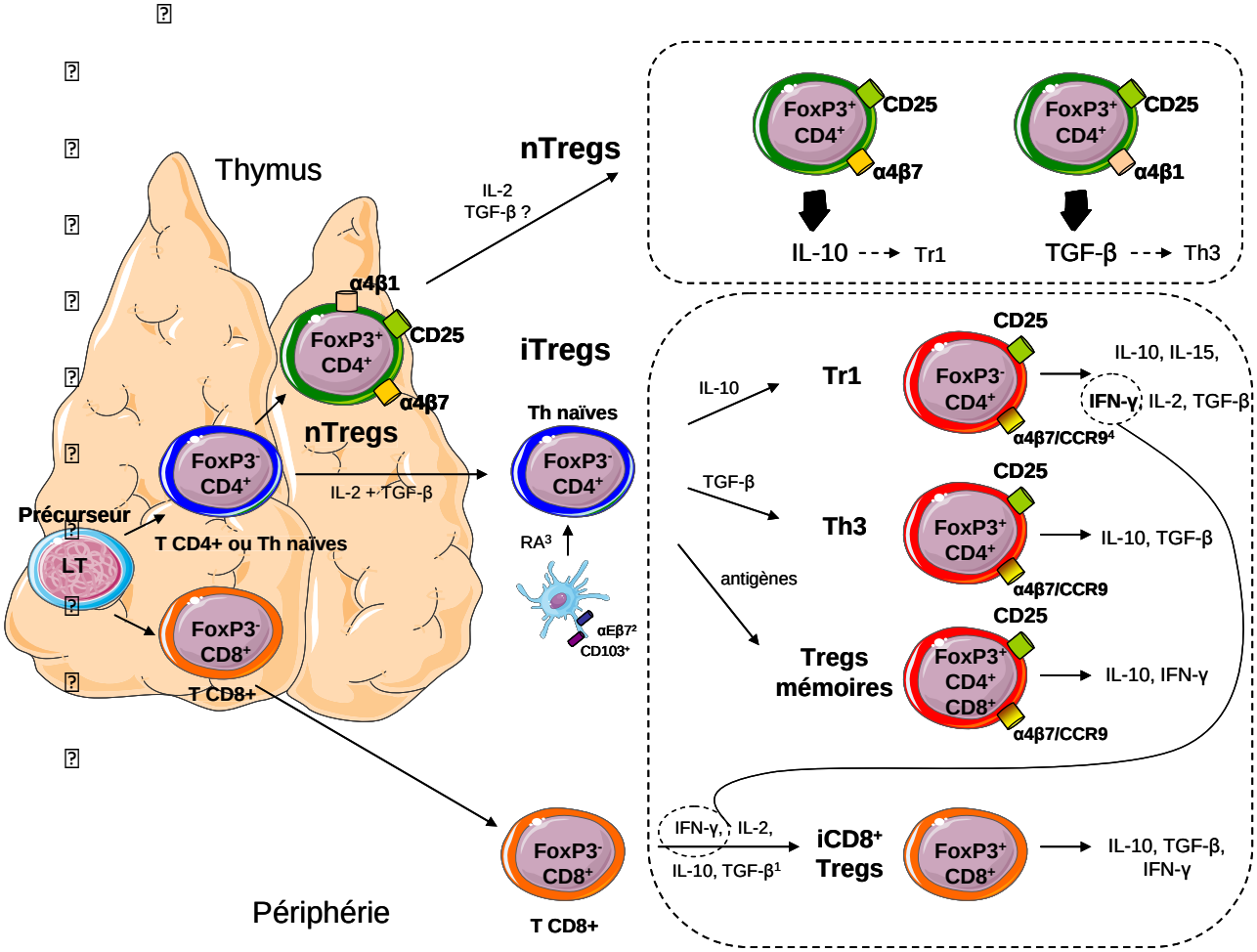
Figure 15: Actions des LT régulateurs face à l'induction des réponses T effectrices

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).


Thymus
nTregs
IL-2
TGF-β ?
α4β1
FoxP3+
CD4+
CD25
α4β7
iTregs
Th naïves
nTregs
FoxP3-
CD4+
IL-2 + TGF-β
Précurseur
LT
T CD4+ ou Th naïves
FoxP3-
CD8+
T CD8+
RA3
αEβ7²
CD103+
Périphérie
T CD8+
IL-10
Tr1
IL-10, IL-15,
IFN-γ, IL-2, TGF-β
α4β7/CCR9⁴
TGF-β
Th3
IL-10, TGF-β
α4β7/CCR9
antigènes
Tregs
mémoires
IL-10, IFN-γ
α4β7/CCR9
IFN-γ, IL-2,
IL-10, TGF-β¹
iCD8+
Tregs
IL-10, TGF-β,
IFN-γ

[illegible]

[illegible]

[illegible]

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 α4β7 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 α4β1 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	<u>Marqueurs de surface</u> • IL-2R(α) = CD25$^+$, CD4$^+$, CD8$^-$ <u>Molécules de costimulation / activation</u> • TCRαβ$^+$, CD80/86$^+$, CD28$^+$, CD40$^+$/CD40L$^+$, CTLA-4$^+$, LAG-3$^+$, CD39$^+$, CD73$^+$ <u>Intégrines et récepteurs aux chémokines</u> •α4β7$^+$, α4β1$^+$, CCR9$^+$ <u>Marqueur spécifique des Tregs</u> • FoxP3$^+$ <u>Récepteur de cytokines/ cytokines</u> • IL-7R = CD127^{low}, IL-10^{high}, TGF-β$^+$	CD25$^+$, CD4$^+$, CD8$^-$ TCRαβ$^+$, CD80/86$^+$, CD28$^+$, CD62L$^+$, CD40$^+$/CD40L$^+$, CTLA-4$^+$, LAG-3$^+$ CCR3$^+$ CCR4$^+$ CCR5$^+$ CCR8$^+$ FoxP3$^-$ IL-10^{high}, TGF-β ^{high} IL-15^{int} IFN-γ ^{low}, IL-2^{low} IL-4$^-$	CD25$^+$, CD4$^+$, CD8$^-$ TCRαβ$^+$, CD80/86$^+$, CD28$^+$, CD62L$^+$, CD40$^+$/CD40L$^+$, CTLA-4$^+$, LAG-3$^+$ α4β7$^+$, CCR9$^+$ FoxP3$^+$ IL-10^{high}, TGF-β ^{high}	CD25$^+$, IL-2R(β) = CD122$^+$, CD4$^-$, CD8$^+$ TCRαβ$^+$, CD80/86$^+$, CD28$^{+/-}$, CD40$^+$/CD40L$^+$, CTLA-4$^+$, LAG-3$^+$ CD103$^+$ FoxP3$^+$ IL-10^{high}, TGF-β ^{high} IFN-γ$^+$,	CD25$^+$, CD4$^+$, CD8$^+$ TCRαβ$^+$, CD80/86$^+$, CD28$^{+/-}$, CD40$^+$/CD40L$^+$, CTLA-4$^+$, LAG-3$^+$ CCR7$^{+/-}$ FoxP3$^+$ IL-10^{high}, TGF-β ^{high} IFN-γ$^+$,

<u>Tableau 6 :</u> 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 lymphoipoietin (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** (**i$CD8^+$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 dediverses 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, TCRαβ, 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 connu, 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) β7 présent à la surface des DCs $CD103^+$. Ces DCs $CD103^+$(αEβ7) 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 $CD8^+$: i$CD8^+$Tregs

Les cellules i$CD8^+$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 i$CD8^+$Tregs représentent moins d'1% des cellules T $CD8^+$ qui pour 40% d'entres 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 i$CD8^+$Tregs présentent les marqueurs caractéristiques des cellules T activées comme le CD122 (chaine 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 i$CD8^+$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 i$CD8^+$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 entraine 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 différents 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 $FoxP3^+TCR\alpha\beta^+$ sécrètent de l'IL-10 et de l'IFN-γ.

Bien qu'elles soit très peu étudiées, le porc compte également une population majeure de cellules Tαβ $CD4^+CD8^+$ exprimant le FoxP3 décrites par Käser et collaborateurs en 2008 (Kaser et al., 2008a) (Tableau 5).

3.6.2. Rôles et différent mode d'action des Tregs

Le rôle majeur des Tregs est de supprimer l'activité des cellules T effectrices. Cependant, chaque sous population de cellules Tregs agit sur différentes cibles et n'ont pas toujours les mêmes mécanismes d'action (Figure 17).

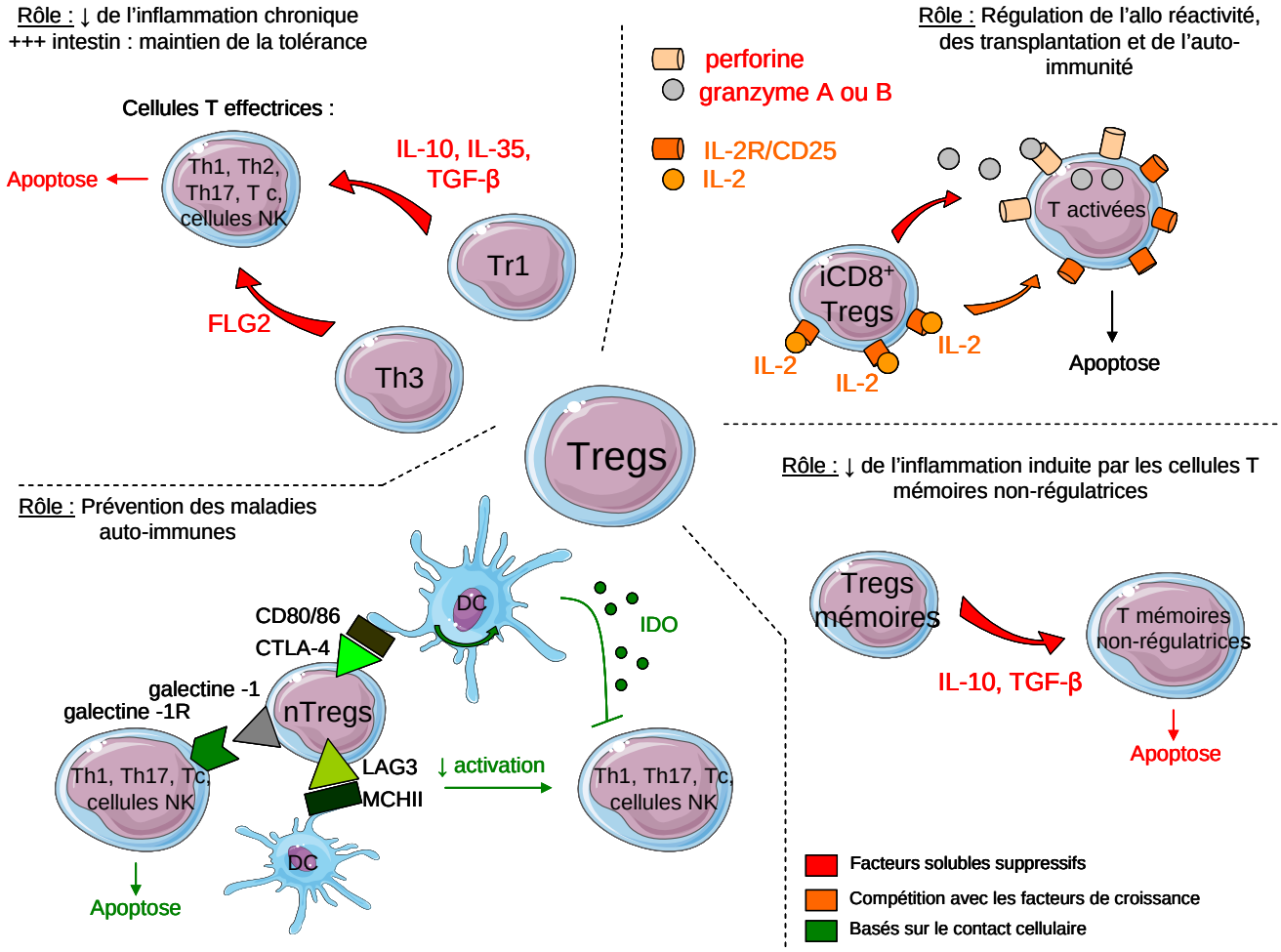


Figure 17: Mécanismes d'action et cellules cibles des Tregs

Ainsi contrairement aux nTregs dont le rôle semble préférentiellement lié à la prévention des maladies auto-immunes, les iTregs semblent majoritairement impliquées dans la diminution de l'inflammation chronique et le maintien d'un environnement non-

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) posséde un effet apoptotique sur les populations T effectrices (Shalev et al., 2009). Les facteurs solubles constituants 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-γt, 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).

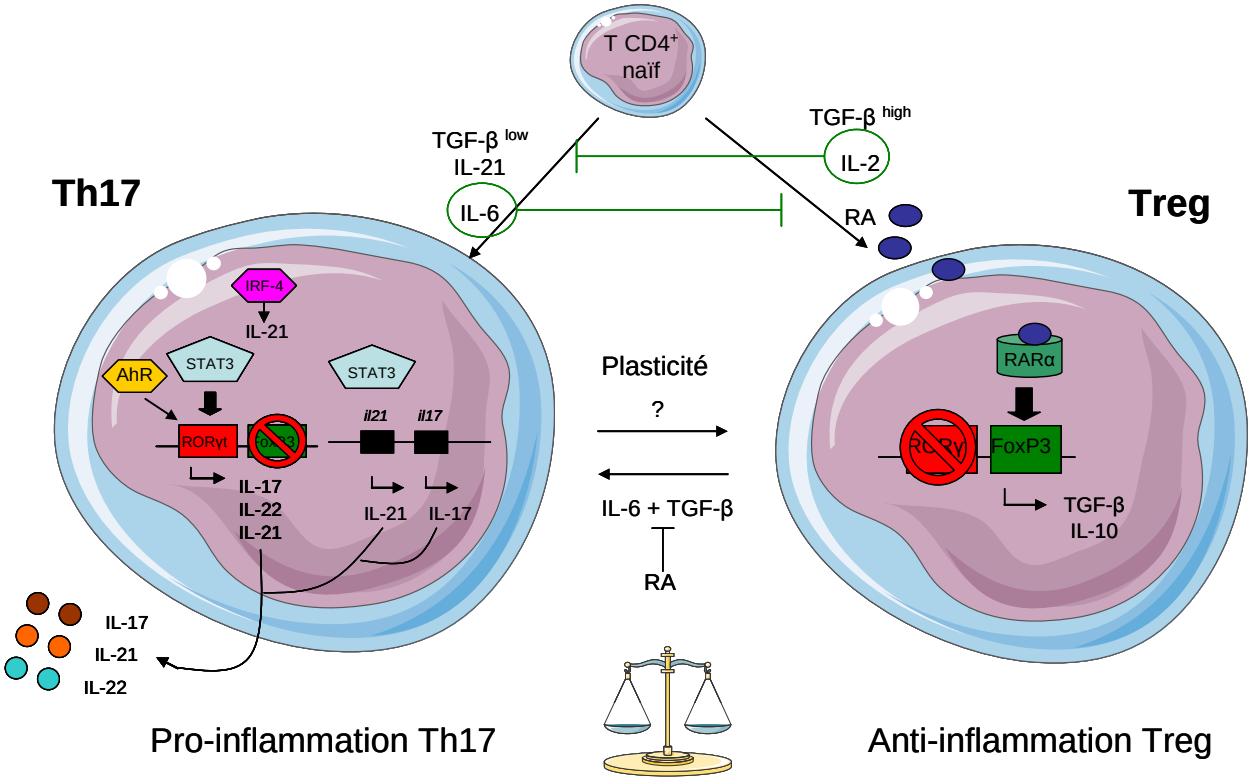


Figure 18: Balance inflammatoire Th17 – Tregs

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/RORγt. 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 nucléique **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 reprogrammé 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 RORγt et RORα provenant de l'inhibition générée par FoxP3 (Korn, 2009).

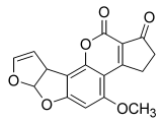
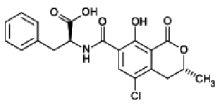
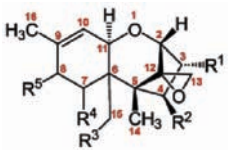
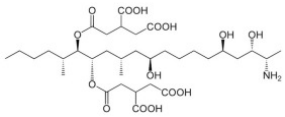
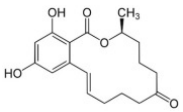
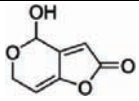
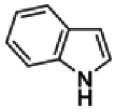
De plus, il est à noter que génétiquement les facteurs de transcription RORγt et RORα sont physiquement associés avec le FoxP3 sur un même locus (Du et al., 2008). Cette association constitue la base moléculaire de la relation réciproque entre les cellules Th17 et Tregs.

Chapitre 2 : Les mycotoxines

A. Généralités sur les mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires de diverse nature chimique synthétisées par des champignons filamenteux toxinogènes 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 complexicité 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		*Aspergillus flavus, A. parasiticus, A. nomius*
Ochratoxine A		*Pénicillium verrucosum, A. ochraceus, A. carbonarius*
Trichothécènes (A et B)		*Fusarium graminearum, F. culmorum, F. langsethiae, F. poae, F. sporotrichoïdes, F. tricinctum, Trichoderma spp, Stachybotrys spp.*
Fumonisine B1		*Fusarium graminearum, F. culmorum, F. crookwellense*
Zéaralénone		*Fusarium verticillioides, F. proliferatum*
Patuline		*Pénicillium expansum, A.clavatus, Byssochlamys nivea*
Alcaloïdes d'ergot (dit ergot du seigle)		*Claviceps purpurea, C. paspali, C. africana, C. fusiformis*

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

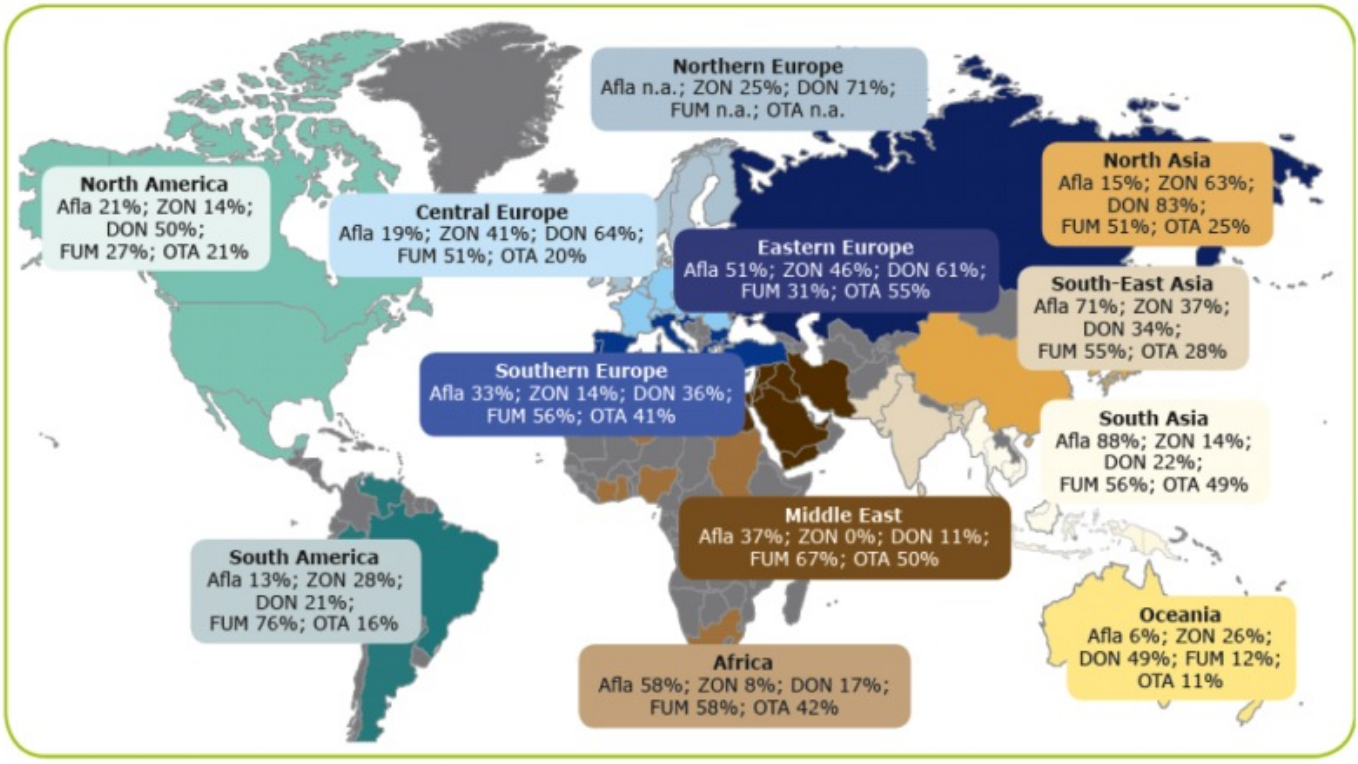
exemple, est alors fréquente tout au long de la vie et le faible diamétre (de 2 à 3 mm) de ces spores leur permet d'atteindre facilement le tractus respiratoire ou encore de traverser les alvéoles pulmonaires (Gauthier et al., 2012).

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 toxinogènes et le développement de procédés d'élimination ou d'inactivation de ces toxines présentent un véritable défit pour la santé humaine et animale.

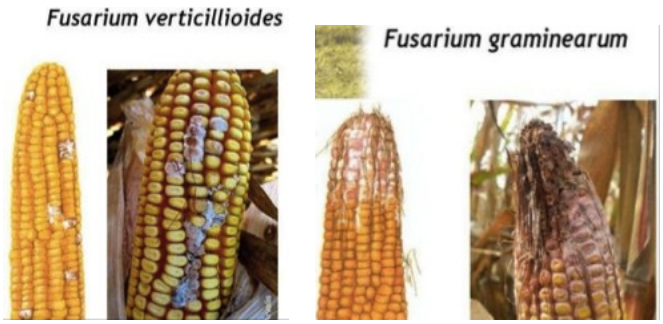
1. Contamination par la voie alimentaire

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.



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 complexicité des répercutions 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* entrainent 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 », entrainant 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

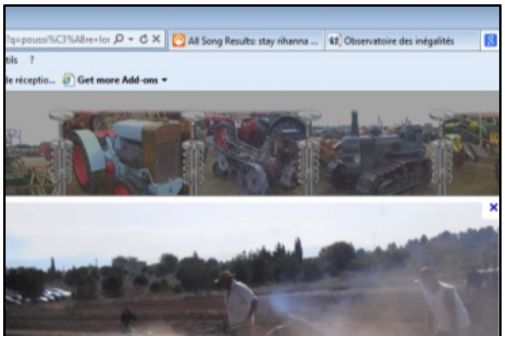
produites par *Aspergillus flavus* en quantités importantes dans la farine d'arachide importée du Brésil dont on nourrissait les volailles. Au-delà des mycotoxicoses due à une contamination aigue, l'ingestion de mycotoxines sur une longue période peut induire une diminution de la productivité, une détérioration 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,…**	• **Asthme, rhinite,** • **Bronchite chronique,** • **Obstruction bronchique,**
Microorganismes • **Moisissures** • **Bactéries (dont actinomycètes thermophiles)** • **Toxines bactériennes et fongiques**	• **Alvéolite allergique extrinsèque,** • **Organic dust toxic syndrome,** • **Asthme et hyperréactivité bronchique,** • **Obstruction bronchique chronique**
Protéines et squames animales	• **Asthme, rhinite,** • **Alvéolite allergique extrinsèque**
Acariens et insectes	• **Asthme, rhinite,** • **Alvéolite allergique extrinsèque**
Produits chimiques et gaz toxiques NH_3, H_2S, CO_2, CO, NO_2, SO_2,	• **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 trouves 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 toxinogènes 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 intallation 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 diacetoxyscirpénol (DAS), le 3-acétyl-déoxynivalénol (3a-DON), le déoxynivénol (DON) et la toxine T-2 (Tuomi et al., 2000).

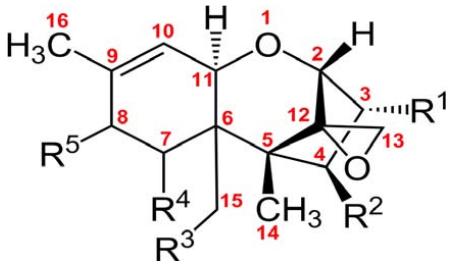
La présence de diverses moisissures productrices de nombreuses mycotoxines a été identifiée dans les échantillons de poussières et d'air ambiant de foyers canadiens (Kuhn and Ghannoum, 2003; Scott, 1986). De plus, la présence de mycotoxines de la famille des trichothécènes, notamment de la toxine T-2 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 émergeant du fait de l'augmentation de la présence des champignons producteurs de trichothécènes dans l'hémisphère nord et notamment en Europe.

Le déoxynivalenol (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 sesquipertènoïdes 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 carbonyl 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 crotocine et les trichothécènes du groupe D composés de la verrucarine A et de la rorodin A (Ueno, 1984).



Trichothécènes	*R1*	*R2*	*R3*	*R4*	*R5*
Type A					
Toxine T-2	OH	OAc	OAc	H	$(CH_3)_2CHCH_2COO$
Toxine HT-2	OH	OH	OAc	H	$(CH_3)_2CHCH_2COO$
Diacétoxyscripénol	OH	CH_3COO^-	CH_3COO	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 entrainer 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 déterminée 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, glucuronoconjugaison 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 (DL_{50}) 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 DL_{50} 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 (DL_{50} de 4,5 mg/kg pc) et 20 fois plus toxique qu'une exposition dermale (DL_{50} 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 DL_{50} 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 entraine 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 léthale) 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 décroit 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 syndrôme 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 léthales 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 diminition de la réponse macrophagique après stimulation par le ligand du TLR4, le lipopolyssaccharide (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-1α 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 3α,7α,15-trihydroxy-12,13-epoxytrichithec-9-en-8-one, de formule brute $C_{15}H_{20}O_7$ 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 important 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 µg/kg pc/j et peut atteindre 0,57 µg/kg pc/j. Les enfants sont exposés à une dose en DON en moyenne de 0,45 µg/kg pc/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 (µg/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.

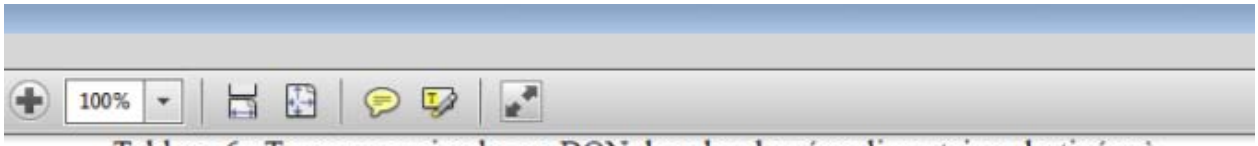


Tableau 6 : Teneurs maximales en DON dans les denrées alimentaires destinées à l'alimentation humaine

Produits	Teneur maximale recommandée en µg/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 DL_{50} 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 entraine 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-1β) (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 3ème et le 7ème 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 µM) 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-1β 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 reconnaitre les trichothécènes comme un signal de danger. Le DON a ainsi la capacité d'activer la caspase-1 permettant la sécrétion d'IL-1β 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 toxinogènes 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 toxinogènes 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 synthése 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 moisis 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 le 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 absorbants piègent les mycotoxines et limitent ainsi leurs adsorptions au niveau du tractus gastro-intestinal. Il existe deux types d'absorbants : d'une part les absorbants inorganiques comprenant les argiles tels que les allulminosillicates 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 glucomananes 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 isolées 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* référée 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

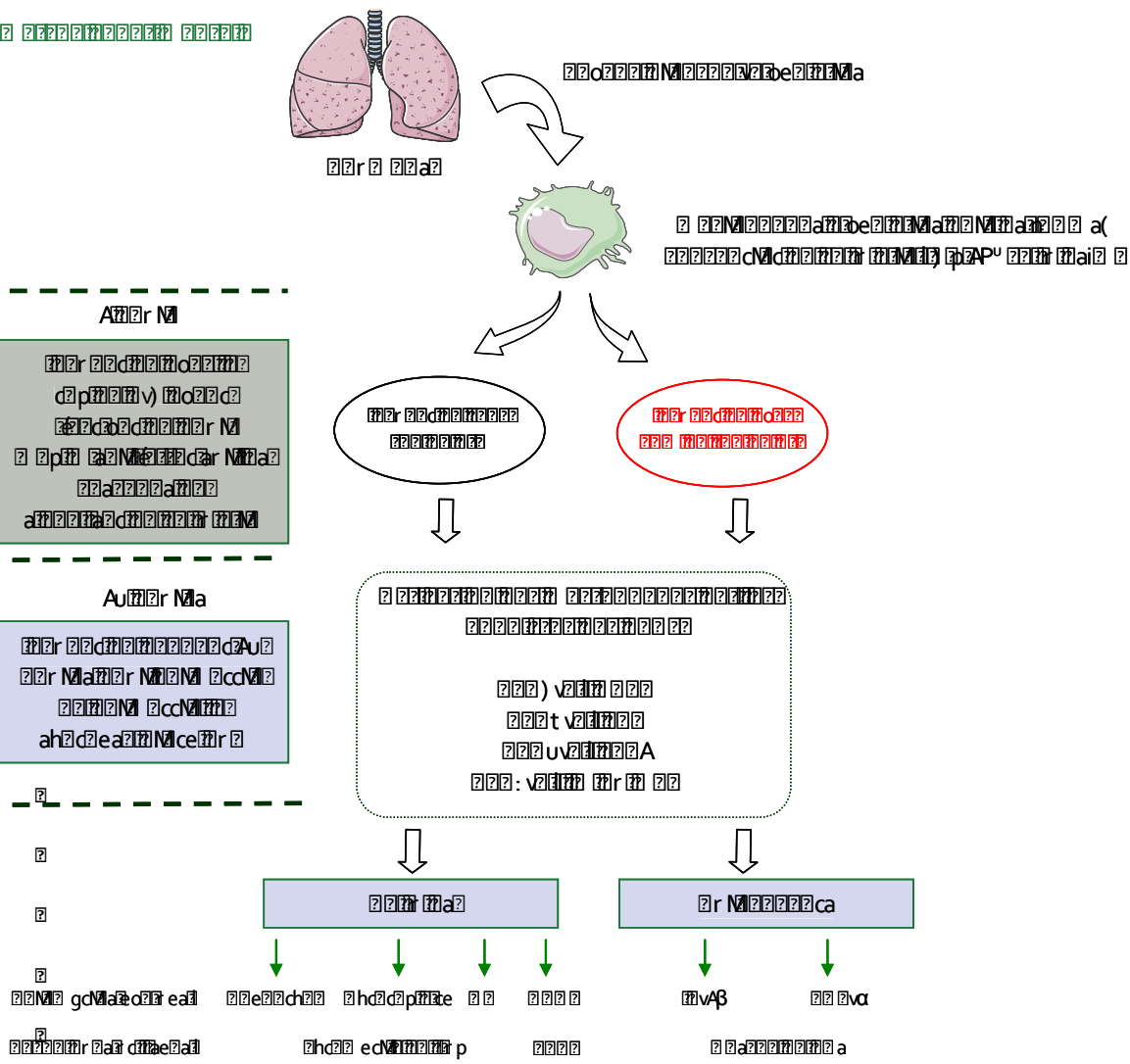
Les données bibliographiques qui ont été décrites mettent en évidence d'une part l'importance du maintien de l'homéostasie immunitaire au niveau des différentes muqueuses (respiratoire ou intestinale) et d'autre part l'impact des mycotoxines dans la modulation des réponses immunitaires (inflammatoire, 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 :

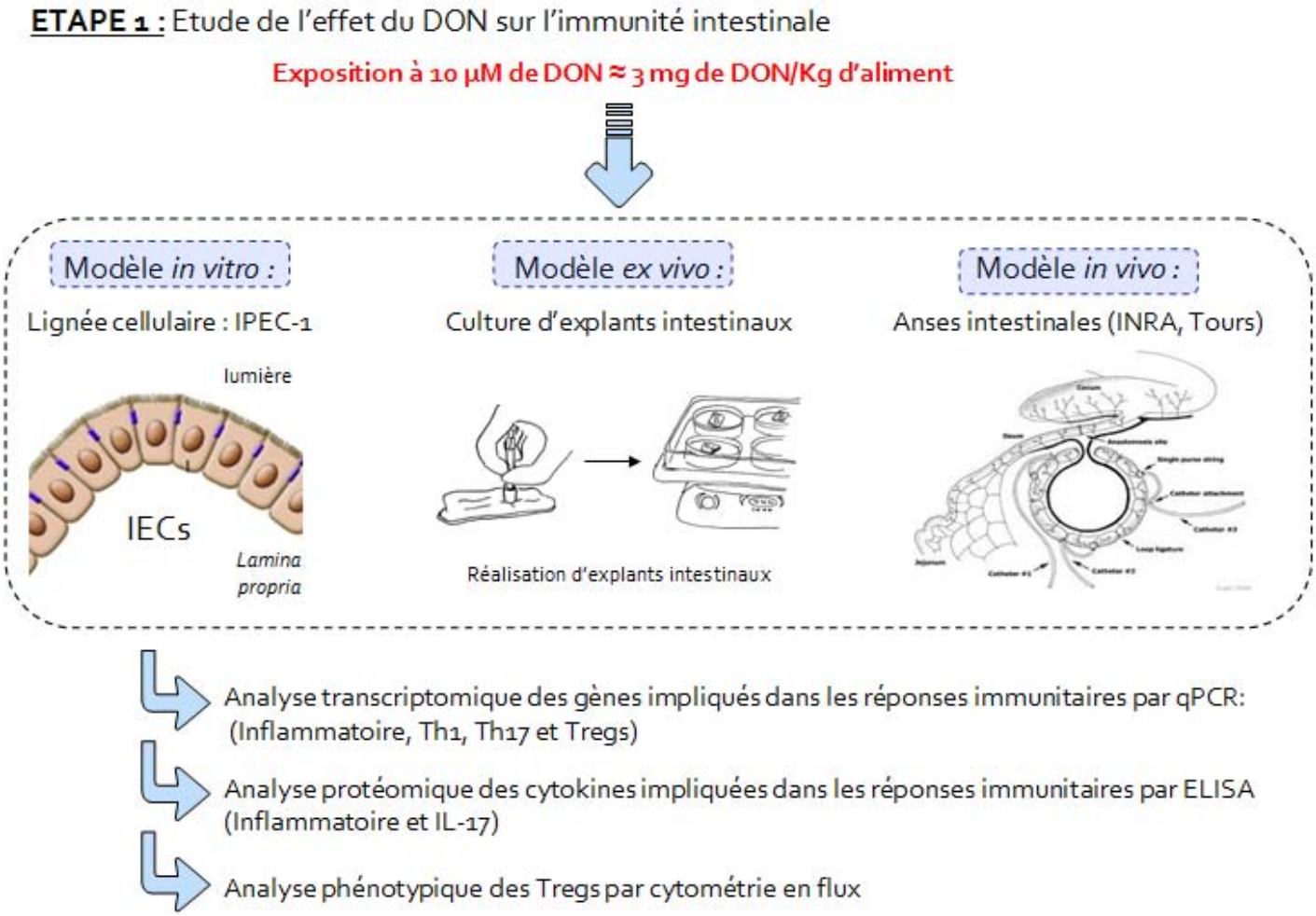
1°) **Objectif 1 :** Dans le cadre d'une pré-exposition de la muqueuse respiratoire à de faibles doses de toxine T-2, l'objectif était de déterminer si cette toxine était capable d'altérer l'activation des macrophages connus pour être des médiateurs importants dans la mise en place d'une réponse inflammatoire. 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.



a pi 45 aà ç ct t ANaçà t u, ât à hRt t u Nâ t Nn' çaNnueçt âwst , h/ L

+γY **n Aar 4** uRât eçt ev'ut t ANnRh,hnu et à ' F' t' Rt hu,t R,huât t , â ,nAhut ..+f t ,çy hât t' Nn' çnst , h et ea,t çà hut çâwllt, et t Rt et' A,çh cn,ca rut R R' çâwnà anR, R ht hulâ à , nhçt hu,t R,huât à aehat Nç ehlaçt u,R,qNt R t âã âhçt Renu, ât R Rfât R t âã ât R et ueçh,hF' t Rt , ât Râqà Ncn q,t RL t ,çy h â a,aehyhRa t u et' A a,N t R â Nçt à hrçt a,Nt nuRhR,a t u' ut â qRt et R çhN,hyt et âwllt, e' R' çâ çaNnuRt hulâ à , nhçt hu,t R,huât yh âw,hâhR, hnu et ô à ner ât R ev tANnRh,hnu ehlaçt u,R 8 r n xi é N n i t , r n i YL Rt nuet a,N t nuRhR,a nà Nç t çât R t llt,R e' t , et â ,nAhut ..+ R' çâwnà anR, R ht hu,t R,huât ,çy t çR' ut a,' et ,çy R çhN,nà hF' t ' ,hâhR , ât à ner ât N

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.



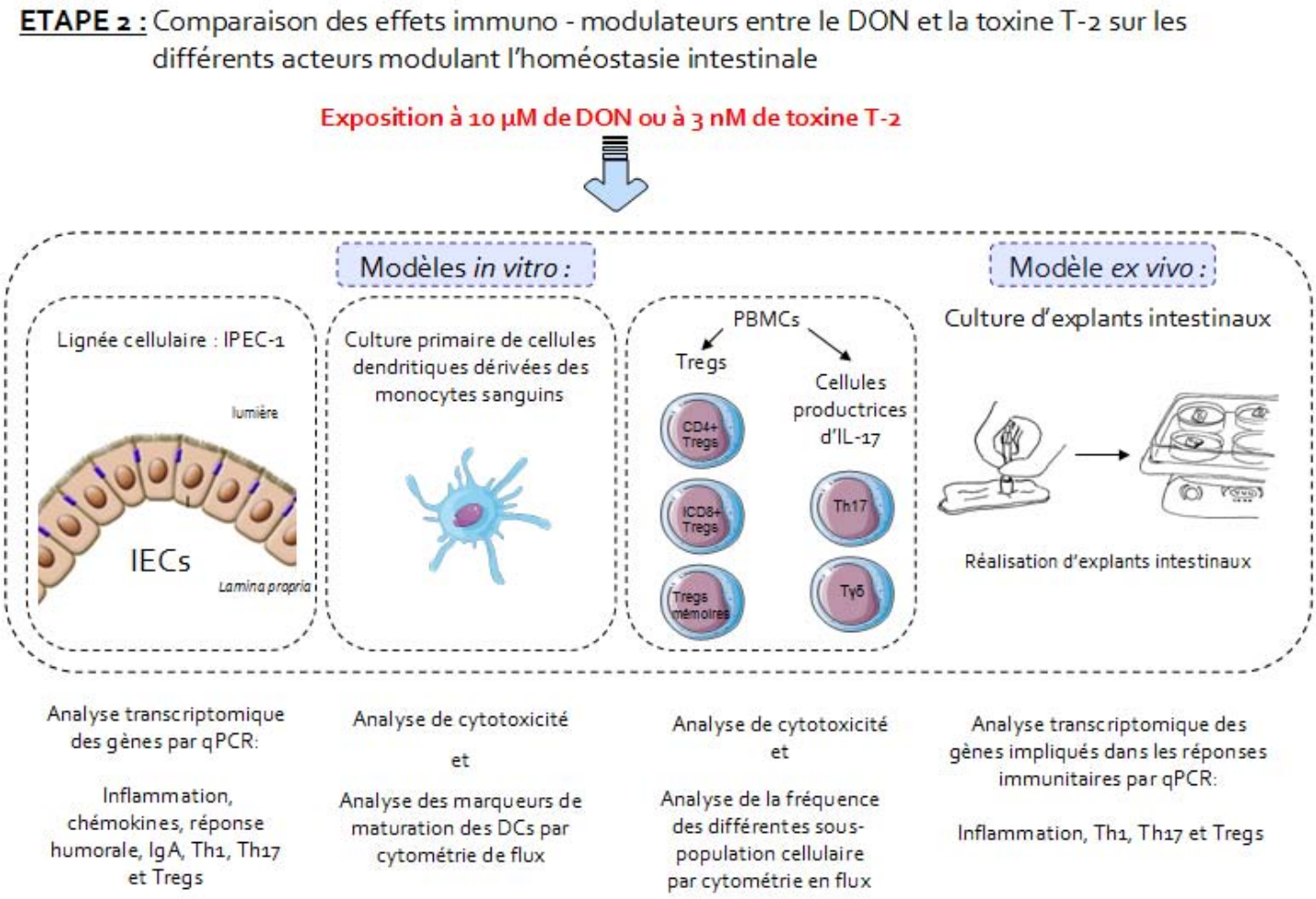


Figure 24 : Démarche expérimentale mise en place pour répondre à l'objectif 2

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.

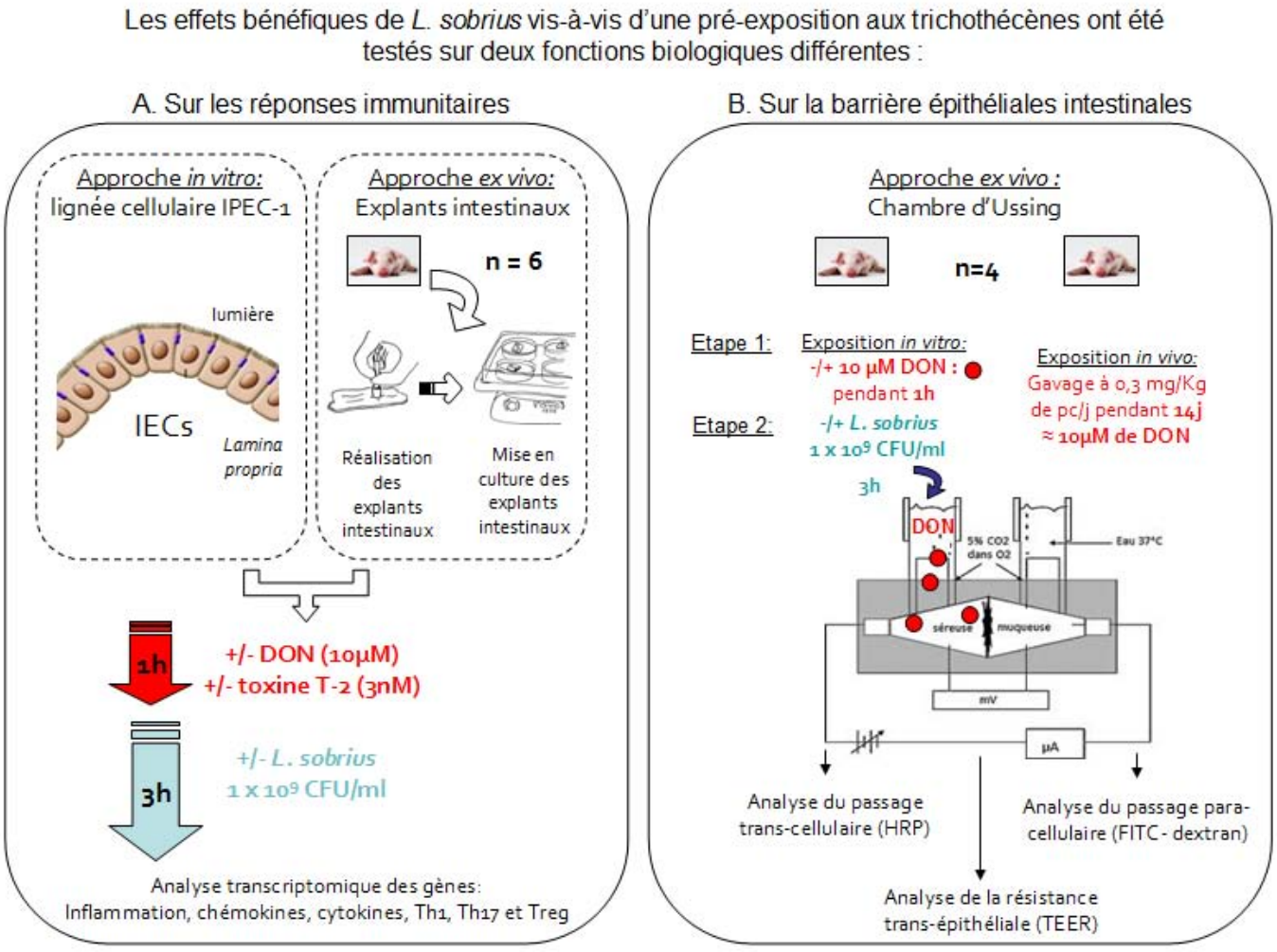


Figure 25 : Démarche expérimentale mise en place pour répondre à l'objectif 3

TRAVAIL EXPERIMENTAL

ETUDE 1:

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

Dans ce premier chapitre, l'effet de la toxine T-2 sur la réponse inflammatoire au niveau du BALT a été déterminé.

Largement prédominantes en Europe dans les produits céréaliers, les mycotoxines sont des métabolites secondaires synthétisés par différentes espèces de moisissures. Elles sont ingérées de façon chronique par les animaux d'élevages tels que les porcs et sont devenues un réel problème tant sur le plan économique qu'en santé animale. Parmi ces mycotoxines, la toxine T-2 est connue pour être l'une des mycotoxines les plus toxiques appartenant au groupe des trichothécènes. Elle est à l'origine de nombreux troubles hématologiques et immunologiques notamment dans les phénomènes d'immunomodulation de la réponse immunitaire innée.

L'objectif de ce travail était d'étudier les effets *in vitro* de la toxine T-2 sur l'activation par les ligands des TLRs -2 (HKLM), -4 (LPS), -6 (FSL-1) et -7 (Imiquimod) des macrophages alvéolaires porcins (PAMs). Les Toll-like receptors (TLRs) étant des récepteurs capables de reconnaître des motifs moléculaires qu'ils soient bactériens ou viraux, une interaction récepteur-ligand permet alors d'initier des cascades de signalisation conduisant à la mise en place d'une réponse immunitaire pro-inflammatoires.

Ce travail a permis d'observer qu'une incubation en présence de toxine T-2, à une très faible concentration non cytotoxique (3 nM), avant l'activation des macrophages par les ligands des TLRs localisés à la surface cellulaire et répondant à des motifs bactériens (ligands des TLRs -2, -4 et -6) diminue de façon significative la production des cytokines pro-inflammatoires (IL1-β et TNF-α) mais également la production de monoxyde d'azote (NO). En revanche, l'effet de cette même incubation avant l'activation des macrophages par le ligand

du TLR-7, localisé au niveau endosomal et répondant à des motifs viraux, ne semble pas affecter la réponse inflammatoire. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de la toxine T-2 sur la réponse pro-inflammatoire, nous avons analysés l'effet de cette toxine sur l'expression des différents TLRs. Ces travaux ont pu mettre en évidence que la toxine T-2 diminue de façon significative l'expression des TLRs préférentiellement localisés à la surface cellulaire et répondant à des motifs bactériens (TLRs -2, -4 et -6).

Ces résultats suggèrent que de très faibles doses de toxine T-2 influencent la réponse immunitaire inflammatoire contre les pathogènes, en diminuant la production des cytokines pro-inflammatoires, consécutif à la diminution de l'expression des récepteurs de reconnaissance des motifs bactériens situés à la surface cellulaire. Cette toxine pourrait ainsi jouer un rôle déterminant dans la résistance des porcs face aux infections microbiennes et être ainsi la cause de problème sanitaire important pour la filière de production porcine.

Ce travail a donné lieu à la publication suivante parue dans **Veterinary research (IP : 3,43)** :

Julie Seeboth, Romain Solinhac, Isabelle P. Oswald and Laurence Guzylack-Piriou. 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. Veterinary research 2012, 43:35

Seeboth et al. Veterinary Research 2012, 43:35
http://www.veterinaryresearch.org/content/43/1/35

VETERINARY RESEARCH

RESEARCH Open Access

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

Julie Seeboth, Romain Solinhac, Isabelle P Oswald* and Laurence Guzylack-Piriou*

Abstract

T-2 toxin is known to be one of the most toxic trichothecene mycotoxins. Exposure to T-2 toxin induces many hematologic and immunotoxic disorders and is involved in immuno-modulation of the innate immune response. The objective of this work was to evaluate the effects of T-2 toxin on the activation of macrophages by different agonists of Toll-like receptors (TLR) using an in vitro model of primary porcine alveolar macrophages (PAM). Cytotoxic effects of T-2 toxin on PAM were first evaluated. An IC_{50} of 19.47 ± 0.9753 nM was determined for the cytotoxicity of T-2 toxin. A working concentration of 3 nM of T-2 toxin was chosen to test the effect of T-2 toxin on TLR activation; this dose was not cytotoxic and did not induce apoptosis as demonstrated by Annexin/PI staining. A pre-exposure of macrophages to 3 nM of T-2 toxin decreased the production of inflammatory mediators (IL-1 beta, TNF-alpha, nitric oxide) in response to LPS and FSL1, TLR4 and TLR2/6 agonists respectively. The decrease of the pro-inflammatory response is associated with a decrease of TLR mRNA expression. By contrast, the activation of TLR7 by ssRNA was not modulated by T-2 toxin pre-treatment. In conclusion, our results suggest that ingestion of low concentrations of T-2 toxin affects the TLR activation by decreasing pattern recognition of pathogens and thus interferes with initiation of inflammatory immune response against bacteria and viruses. Consequently, mycotoxins could increase the susceptibility of humans and animals to infectious diseases.

Introduction

The Food and Agricultural Organization (FAO) estimates that mycotoxins, secondary metabolites produced by fungi, contaminate 25% of the world's agricultural commodities. The presence of mycotoxins alters the quality of agricultural products resulting in economical losses estimated in billions dollars annually worldwide [1,2]. The consumption of food and feed contaminated by mycotoxins is a potential health hazard for both humans and animals [3,4]. Among mycotoxins, T-2 toxin is the most common trichothecene mycotoxin belonging to type A and is produced predominantly by *Fusarium sporotrichioïdes* and *F. langsethiae* [4,5]. This toxin is known to be the most cytotoxic of the trichothecene family [6]. An exposure of T-2 toxin is associated with leucopenia and cell depletion in lymphoid organs and inhibition of erythropoiesis in bone marrow and the spleen [7]. Furthermore, T-2 toxin reduces lymphocyte proliferative response [8,9] and disturbs the maturation process of dendritic cells [10] suggesting its immunosuppressant potency [7,11]. Indeed, it was previously shown that exposure to T-2 suppresses immune response to systemic infections by bacterial infection such as *Salmonella typhimurium* [12], *Listeria monocytogenes* [13], *Mycobacterium bovis* [13], *Babesia microti* [14]. Respiratory immune defences are also compromised by T-2 exposure. Indeed Li et al. [15] showed that systemic T-2 exposure increases the severity of respiratory reovirus infection with marked exacerbation of bronchopneumonia and modulation of cytokine responses in mice alveolar macrophages.

Among other species, swine react most sensitively to the exposure to trichothecenes [16]. Pigs are particularly

* Correspondence: Isabelle.Oswald@toulouse.inra.fr; laurence.guzylack@toulouse.inra.fr
Institut National de Recherche Agronomique, Toxalim – UMR 1331, 180, chemin de Tournefeuille, Toulouse Cedex 931027, France

BioMed Central

© 2012 Julie et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

interesting as a target species for mycotoxin due to their diet rich in cereals and because the pig shares strong similarities with the human immune system [17]. Moreover, swine are the target of several pathogenic agents responsible for many respiratory diseases such as Influenza virus, porcine reproductive and respiratory syndromes (SPRD), or bacteria as *Haemophilus parasuis*. Then, mycotoxins, especially T-2 toxin, could play a determining role in lowering the immune response of pigs to these bacterial and viral infections.

Macrophages play a key role in the immune response being the first cells to be exposed to microorganisms. These cells are considered as sentinel cells against infectious pathogens and involved in phagocytosis, antigen presentation, production of antimicrobial effector molecules and release of cytokines and chemokines that in turn contribute to immune cell recruitment and activation [18-20]. The recognition of microorganisms by macrophages occurs through a major receptor family expressed in distinct cell subsets and tissues called the Toll-Like Receptors (TLR) [21-23]. They are able to bind to a wide range of motifs derived from bacteria (lipopolysaccharide (LPS), peptidoglycan), parasites, fungi and viruses (ssRNA, dsRNA, CpG DNA) [21,24]. Interaction of TLR with its specific ligands leads to the induction of various inflammatory cytokines such as IL-1β and TNF-α [25] and reactive nitrogen species [26]. This pro-inflammatory response is the first line of defence against infections.

Since macrophages are privileged targets of T-2 toxin [10,27,28], it is important to better understand how this toxin can impair their function. In the current study, we investigated the effect of T-2 toxin on macrophage activation. We especially measured the ability of T-2 toxin to inhibit the production of inflammation mediators upon TLR activation as well as the effect of this toxin on TLR gene expression.

Materials and methods

Isolation, phenotype and culture of macrophages

Porcine alveolar macrophages (PAM) from 6- to 8-week-old pigs were isolated by three time bronchoalveolar lavages using cold PBS (Invitrogen, Auckland, NZ). Bronchoalveolar fluids were centrifuged at 400*g* for 15 min at 4°C and cell viability was assessed using Trypan blue exclusion. Next, the cells were frozen in liquid nitrogen in 90% FBS and 10% DMSO. After thawing, the cells were adjusted to a cell concentration of 2×10^6 cells/mL in RPMI (Invitrogen) supplemented with 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen), 1% non essential amino acid (Sigma Aldrich, Ayshire, UK) and 1% L-glutamin (Eurobio, Courtaboeuf, France).

The phenotypic identification of PAM was realized by analyzing the expression of differentiation or maturation markers: SWC1, SWC3, CD14, CD16, CD163, MHCII and DC-sign. Anti-SWC1 IgM 11-305-44 and rabbit-DC-sign antibodies were a kind gift from Dr A. Saalmüller (Veterinary University Vienna, Austria) and Dr M. Meng (College of veterinary medicine, Virginia, USA). Respectively, anti-rabbit-FITC antibody was obtained by Invitrogen. Anti-SWC3 antibodies (clones 74-22-15A and 74-22-15), CD14 (CAM36A), CD16 (G7) and MHCII (MSA3) were commercialised by VMRD (Pullman, USA). CD163 antibody (clone EDHu-1) was purchased from AbD Serotec (Oxford, UK). CD206 (clone 122D2.08) was commercialized by dendritics (Lyon, France). Reaction of all mAbs was revealed using isotype specific FITC, phycoerythrin, or biotinylated IgG F(ab)'2 fragments. Biotinylated conjugates were detected with streptavidin-Cy5-phycoerythrin. All conjugates were purchased from Southern Biotechnology Associates (Birmingham, USA). A negative control containing only conjugated-antibodies was used to visualise a non specific labelling.

PAM were incubated with different doses of T-2 toxin (Sigma Aldrich) for 1 h at 39°C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 and were activated by different specific TLR-agonists during 16 h at 39°C. Indeed, 39°C is the physiological temperature for pigs. Preliminary experiments indicate an optimal production of cytokines by PAM after 16 h of culture in contact with TLR-agonists. TLR-agonists were used with the following concentrations: TLR2-L (HKLM) [10 μg/mL], TLR4-L (LPS) [10 μg/mL], TLR2/6-L (FSL1) [1 μg/mL] and TLR7-L (Imiquimod) [10 μg/mL] (Invivogen, Toulouse, France). The negative control was a dilution of DMSO solution (vehicle of T-2 toxin) used at the higher concentration of T-2 toxin tested in the experiments. As a positive control of PAM activation, cells were stimulated with a combination of LPS [5 μg/mL] (Sigma Aldrich) and IFN-γ [1 ng/mL] (Biosource International, Camarillo, USA). After 4 h of activation, cells were isolated to investigate mRNA expression by quantitative real-time PCR analysis. After 16 h of activation, cells were harvested to evaluate the nitric oxide production and culture supernatant were also collected for pro-inflammatory cytokine analysis.

Cytotoxicity, mitochondrial transmembrane potential and apoptosis assays

Cytotoxicity of T-2 toxin on PAM was measured by CellTiter-Glo luminescent cell viability assay (Promega, Madison, USA). This test is based on the quantification of the ATP assumed to be produced by metabolically active viable cells. It was used according to the manufacturer's protocol. PAM were treated during 16 h at 39°C with different concentrations of T-2 toxin: 0.3; 1; 3; 10; 30 and 100 nM. A negative control using cells without T-2 toxin treatment was in correspondence to 100% of

cell viability. All experiments were performed in triplicate and repeats on cells came from three different piglets. IC_{50} was determined with SigmaPlot software for windows version 11.0 (Systat software Inc., Chicago, USA).

For mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) measurement, cells were treated for 16 h with the same range of T-2 toxin concentrations as previously described. $DIOC_6$ probe obtained by Invitrogen was added to 100 μL of cell suspension and was incubated at 39°C for 20 min. $\Delta\Psi_m$ was analyzed by flow cytometry with excitation at 488 nm. A negative control without T-2 toxin and a positive control, FCCP (Carbonyl cyanid 4-trifluoromethoxy-phenylhydrasone, Enzo Life Sciences,Villeurbanne, France) at 40 mM were used to determine fluctuation of $\Delta\Psi_m$.

Apoptosis was determined by AlexaFluor488-AnnexinV/Death cell apoptosis kit (Invitrogen). The cells were collected, and 2×10^6 cells per mL were resuspended in PBS-1X (pH 7.4) and incubated with AlexaFluor488annexin-V and propidium iodide (PI). The staining was realized according to the manufacturer's recommendation.

Flow cytometric acquisition was performed on a flow cytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) using CellQuest software (Becton Dickinson) and FlowJo software for analysis (Ashland, USA).

IL-1β and TNF-α cytokine assays

Concentrations of IL-1β and TNF-α were measured by enzyme linked immuno-absorbent assays (ELISA) using kits specific for porcine IL-1β and TNF-α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The plates were washed with PBS/Tw20 and then blocked with PBS containing 1% BSA (w/v) for 1 h at RT. The test supernatants were added to the ELISA plate in duplicate and incubated for 2 h at RT. After washing, the wells were incubated with the biotinylated detection anti-porcine TNF-α/TNFSF1A and anti-porcine IL-1β/IL-1 F2 (R&D Systems) antibodies for 2 h at RT. Then, streptavidin-HRP-conjugated antibody (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) was added for 30 min at RT. Positive reactions were revealed by TMB, a colour substrate (Thermo Fisher Scientific) and reactions were stopped with H_2SO_4 2 N. The OD was read at 450 nm. A negative control was in correspondence to non-activated TLR-agonist cells and as a positive control, cells were stimulated with a combination of LPS [5 μg/mL] and IFN-γ [1 ng/mL]. Concentrations obtained in negative control wells were subtracted from the values in treated samples.

Nitric oxide assay

Nitric oxide measurement was performed by DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamino-2′,7′-difluorofluorescein diacetate) probe. The probe used a non-fluorescent reactive base able to react to low doses of nitric oxide forming a fluorescent compound which is detectable by flow cytometry. DAF-FM was used at 10 μM according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). After DAF-FM addition, PAM were incubated at 39°C for 30 min then washed twice with PBS. Cells were incubated another time during 15 min at 39°C to allow a complete esterification of intracellular diacetate and the cell fluorescence emission producing nitric oxide were analyzed by flow cytometry. A negative control was in correspondence to non-activated TLR-agonist cells and as a positive control cells were stimulated with a combination of LPS [5 μg/mL] and IFN-γ [1 ng/mL]. Concentrations obtained in the negative control, including no T-2 toxin and no stimulation with any TLR agonist treatments were subtracted from the values obtained with treated cells.

RNA extraction and quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis

Quantitative real-time PCR was performed to determine the relative TLR −2, -4, -2/6, -7 and iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) mRNA expression levels. Total RNA from 2×10^6 cells/mL unstimulated cells and 2×10^6 cells/mL ligand-stimulated cells in the presence or absence of T-2 toxin was extracted with TRIzol Reagent (Extract all, Eurobio). Concentrations, integrity and quality of RNA were determined spectrophotometrically ($O.D._{260}$) using Nanodrop ND1000 (Labtech International, Paris, France). Then, 300 ng of RNA was reverse transcribed and the reverse transcription and real-time PCR steps were performed as previously described [29]. Non-reverse transcribed RNA was used as the non-template control for verification of a no genomic DNA amplification signal. Specificity of PCR products was assessed at the end of the reaction by analyzing the curve of dissociation. Primers were purchased from Invitrogen. Primers used for real time quantitative polymerase chain reaction are described in Table 1 [30-34]. Amplification efficiency and initial fluorescence were determined by the DART-PCR method, then the values obtained were normalized with housekeeping genes, ribosomal protein L32 (RPL32) and beta2-microglobulin. Finally, relative gene expression was expressed in comparison to the control culture corresponding to unstimulated cells.

Statistics

A Fisher's test was realized followed by the Student's *t*-test to compare values between multiple groups. The statistical analysis of the data was carried out with Statview software (Statistical Analysis System; SAS for Windows 98; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A *P* value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

Table 1 Primers used for real time quantitative polymerase chain reaction. List of gene sequences and primers (For: Forward; Rev: Reverse) used for real-time qPCR of immune-related genes

Oligo Names	Medline mRNA Sequence	Sequence 5′→3′	Reference
β2-microglobuline For β2-microglobuline Rev	MN_213978	TTCTACCTTCTGGTCCACACTGA TCATCCAACCCAGATGCA	[34]
RPL32 For RPL32 Rev	MN_001001636	TGCTCTCAGACCCCTTGTGAAG TTTCCGCCAGTTCCGCTTA	[32]
iNOS For iNOS Rev	EST BI344008	GAGAGGCAGAGGCTTGAGAC TGGAGGAGCTGATGGAGTAG	[30]
TLR2 For TLR2 Rev	AB085935	TCACTTGTCTAACTTATCATCCTCTTG TCAGCGAAGGTGTCATTATTGC	[33]
TLR4 For TLR4 Rev	AB188301	GCCATCGCTGCTAACATCATC TCAGCGAAGGTGTCATTATTGC	[33]
TLR6 For TLR6 Rev	AB085936	AACCTACTGTCATAAGCCTTCATTC GTCTACCACAAATTCACTTTCTTCAG	[33]
TLR7 For TLR7 Rev	AB258453	CAGAAGTCCAAGTTTTTCCAGCTT GGTGAGCCTGTGGATTTGTTG	[31]

Results

Phenotypic characterization of primary porcine alveolar macrophage cells (PAM)

The specific staining with different markers confirmed that more than 95% of the cultured cells were PAM displaying the following phenotypes: $SWC3^{high}$, $SWC1^{+}$, $CD163^{high}$, $CD14^{-}$, $CD16^{+}$, $MHCII^{+}$ and DC-$sign^{+}$ (Additional file 1: Figure S1).

Cytotoxicity effects of T-2 treatment on PAM

A dose-dependent effect of T-2 toxin on cell viability was demonstrated by measuring the cellular ATP level after exposing PAM to increasing concentrations of the toxin (Figure 1a). T-2 toxin did not induce a cytotoxic effect on PAM from 0.3 to 3 nM while exposure to 10 nM of T-2 toxin reduced the ATP level to 82% compared to the untreated cells. At 30 nM, T-2 toxin induced a dramatic drop of cell viability leading to only 31.4% of ATP level compared to the control. IC_{50} value deducted from the dose–response curve was estimated at 19.47 nM +/− 0.9753 nM.

To determine if the loss of cell viability is a consequence of an apoptotic process, the identification of early apoptotic cells was measured using FITC-annexinV reagent in conjunction with a vital dye, propidium iodide (PI). T-2 toxin (<10 nM) did not induce apoptosis (Figure 1b). Only concentrations over 30 nM produced a significant increase of $Annexin^{+}/PI^{-}$ cells (14%), revealing apoptosis of macrophages.

Apoptosis is associated with a loss of mitochondrial membrane potential (Δψm). To confirm the loss of viability induced by T-2 toxin (Figure 1a and b), a DIOC6 staining which is a mitochondrial-specific and voltage-dependent dye was carried out (Figure 1c). As expected, treatment by FCCP, a potent reversible inhibitor of mitochondrial oxidative phosphorylation, used as a positive control, induced a significant decrease of 41.6% of the DIOC6 signal. From 0.3 to 10 nM, T-2 toxin did not affect Δψm, while 30 nM of T-2 toxin significantly reduced Δψm of PAM (63.6% of MFI compared to the control). Thus, DIOC6 staining results confirmed the induction of the apoptosis by high dose of T-2 toxin and demonstrated the similar dose–response regarding ATP level and mitochondrial membrane potential. Based on these results, a concentration of 3 nM was chosen for the following studies.

Alteration of macrophage activation by T-2 toxin

To investigate the effects of T-2 toxin on macrophage activation, the cells were exposed for 1 h to 3 nM of T-2 toxin before being treated with different TLR-agonists during 16 h (TLR2, TLR4, TLR2/6 and TLR7 agonists). Two cytokines involved in the inflammation process were measured to determine the macrophage activation status: IL-1β and TNF-α. The positive control (combination of LPS and IFN-γ) led to high production of both IL-1β and TNF-α, at levels similar to those found with TLR4 agonist (Figure 2a and b). Basal levels of both IL-1β and TNF-α concentrations obtained in the negative control including neither T-2 toxin nor stimulation with TLR-agonists were set off. However, cytokine levels were different depending on the nature of TLR-agonists, demonstrating a specific ability of each TLR-agonist to induce a particular level of cytokine responses in PAM. In particular, TLR2, TLR2/6 and TLR7 agonists seem to induce lower production of TNF-α compared to TLR4 and IFN-γ/LPS (Figure 2b).

Pre-exposure to 3 nM of T-2 toxin significantly decreased both IL-1β and TNF-α induced by TLR2/6 agonist (50.4% and 55.9% reduction of production respectively) and only a significant decrease of IL-1β induced by TLR4 agonist (55.6%). Interestingly, pre-treatment with T-2 toxin did not affect the production of IL-1β and TNF-α cytokines in response to TLR7-agonist activation (Figure 2a and b).

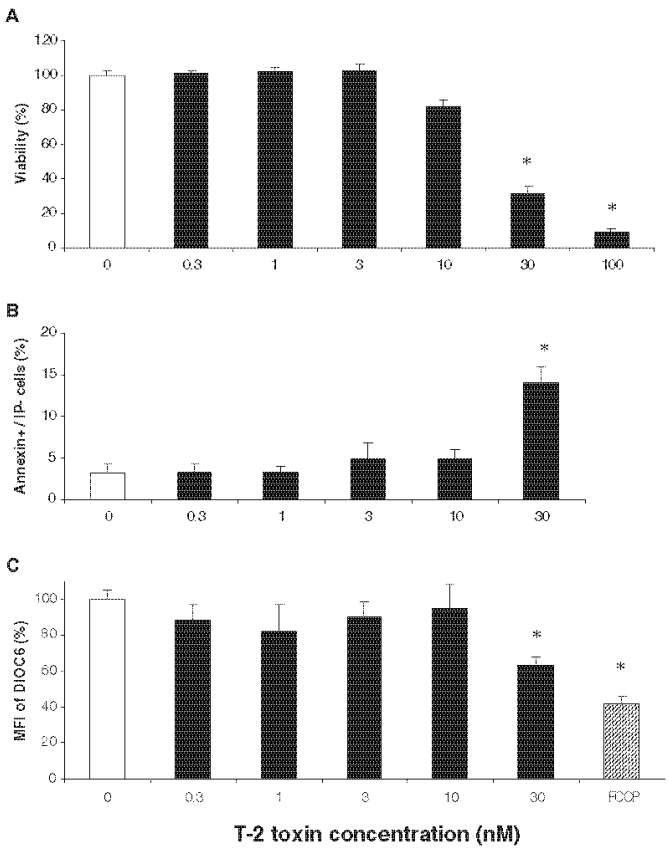


Figure 1 Cell viability and apoptosis induced by T-2 toxin in porcine alveolar macrophages (PAM). A-Decrease of cell viability in PAM treated with different T-2 toxin concentrations. PAM cultures were exposed to 0.3–100 nM of T-2 toxin for 16 h. Cell viability was assessed by measurement of ATP release. B- Increase of apoptosis in PAM as a function of different T-2 toxin concentrations. PAM cultures were exposed to 0.3 to 30 nM of T-2 toxin. Apoptotic cells were analyzed by flow cytometry using a double staining AnnexinV/IP. C- Decrease of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi m$) in PAM treated with T-2 increasing toxin concentrations. PAM cultures were exposed to 0.3 to 30 nM of T-2 toxin, followed by flow cytometry analysis of DIOC6 probe. A positive control, FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxylphenylhydrazone)) was used to establish a loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi m$). All data were reported to the negative control including only the vehicle (0-DMSO), used as 100% of cell viability. Data are shown as mean +/− SEM with PAM from three different piglets are shown and were performed in triplicate. * indicates a P value < 0.05.

Alteration of iNOS gene expression and nitric oxide production induced by macrophage activation after T-2 toxin treatment

Nitric oxide (NO) production plays an important role in the protection against intracellular microbiostasis. NO, produced by macrophages in response to specific stimuli is catalyzed by inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS). Relative gene expression of iNOS was assessed by quantitative real time PCR (Figure 3a). As expected, TLR-agonists induced a significant increase of iNOS expression. By contrast, pre-treatment with T-2 toxin abrogated expression of iNOS induced by all TLR-agonists used. Relative gene expression of iNOS was closer than the expression of negative controls. To confirm these results,the inhibition of NO production in activated PAM by a T-2 toxin pre-treatment was investigated. The production of NO was measured by flow cytometry, using the DAF-FM probe (Figure 3b). As observed for pro-inflammatory cytokines, IFN-γ/LPS combination as well as TLR-agonist stimulation led to NO production by macrophages, thereby confirming the activation process. However, T-2 pre-treatment did not seem to affect production of NO by IFN-γ/LPS co-stimulation. In addition, T-2 toxin pre-treatment significantly decreased to 100 and 72.5% the NO production after activation by TLR4 and TLR2/6 agonists respectively. T-2 toxin pre-exposure has also non-significantly decreased ($p = 0.06$ and

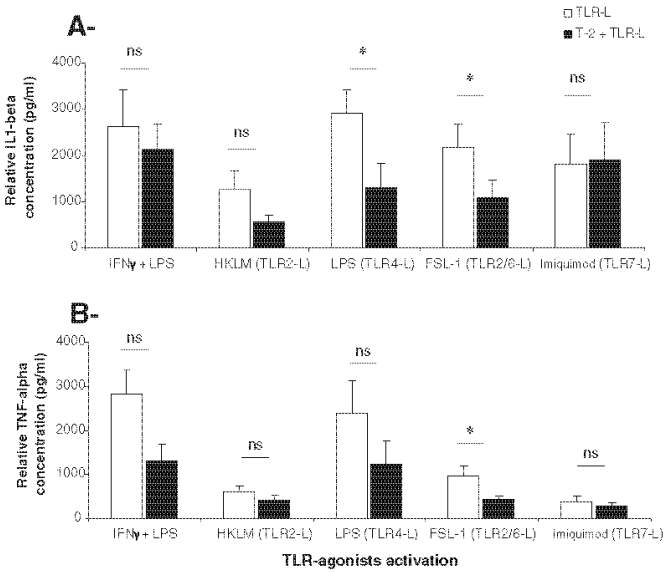


Figure 2 Concentration of IL-1β and TNF-α in supernatants of PAM pre-incubated with T-2 toxin. Cells were cultured for 1 h in the presence (black bars) or absence (white bars) of 3 nM of T-2 toxin before their activation with different TLR-agonists: TLR2-agonist (HKLM = 10 μg/mL); TLR4-agonist (LPS = 10 μg/mL); TLR2/6-agonist (FSL1 = 1 μg/mL) and TLR7-agonist (Imiquimod = 10 μg/mL) for 16 h. IL-1β (A) and TNF-α (B) concentrations were determined by ELISA in PAM culture supernatants. Concentrations obtained in negative controls (vehicle) were subtracted from concentration values in treated samples. The mean (+/− SEM) of the values obtained with PAM from five different piglets are shown. * indicates a P value < 0.05.

$p = 0.32$) the production of NO initiated by the ligands of both TLR2 and −7 (69.8 and 49.0% reduction of production). These data suggest that T-2 treatment alters the implementation of pro-inflammatory response which is initiated by TLR-agonists. Transcriptomic data of iNOS gene expression could partially explain the decrease of NO production by porcine alveolar macrophages observed with DAF-FM staining.

Effects of T-2 toxin on mRNA expression of TLR

To understand the decrease of the pro-inflammatory response, the effect of T-2 toxin on the mRNA expression of specific TLR was evaluated. As expected, treatment of PAM by specific TLR-agonists, led to significant increase in relative mRNA expression of specific TLR (Table 2). It is worth mentioning that T-2 pre-exposure did not lead to a complete inhibition of the mRNA expression. However, a pre-incubation with 3 nM of T-2 toxin before activation induced a significant decrease of 60.1%, 64.3% and 68.8% of relative expression of TLR2, TLR4 and TLR2/6 mRNA expression respectively (Table 2). Remarkably, T-2 toxin did not significantly reduce mRNA expression of TLR7.

Effects of T-2 toxin on the expression of cell surface receptors of macrophages

In order to examine the specificity of action of T-2 toxin on cell surface receptors, we analyzed the expression by flow cytometry of two receptors, namely CD14 (co-receptor with the TLR4 for the detection of bacterial LPS) and CD206 (macrophage mannose receptor) present on the cell surface, after treatment with T-2 toxin (Figure 4). Surprisingly and in contrast to the T-2 toxin action observed on TLR expression, the expression level of both receptors was not affected by the presence of T-2 toxin (Figure 4). Moreover, TLR-agonist stimulation did not induce an increase of expression of these two cell surface markers.

Discussion

Pigs are preferential targets of many respiratory diseases caused by bacteria such as *Pasteurella multocida* [35]. Different swine respiratory viruses such as African swine fever virus (ASFV) [36] or porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) [37] also target alveolar macrophages for their replication. It is well established that when incorporated in feed or given in daily doses, T-2 toxin decreases resistance against viral or bacterial infections [12,15]. Moreover, Ziprin et al. [13] showed that the T-2 toxin effect on the course of in vivo bacterial infection depends on the nature of the infectious agent. Based on these different data, the present study is of further interest to address whether T-2 toxin can similarly reduce immune resistance depending on the nature and composition of microbial pathogens, using TLR4 and TLR6-agonists, structurally conserved molecules derived from these pathogens.

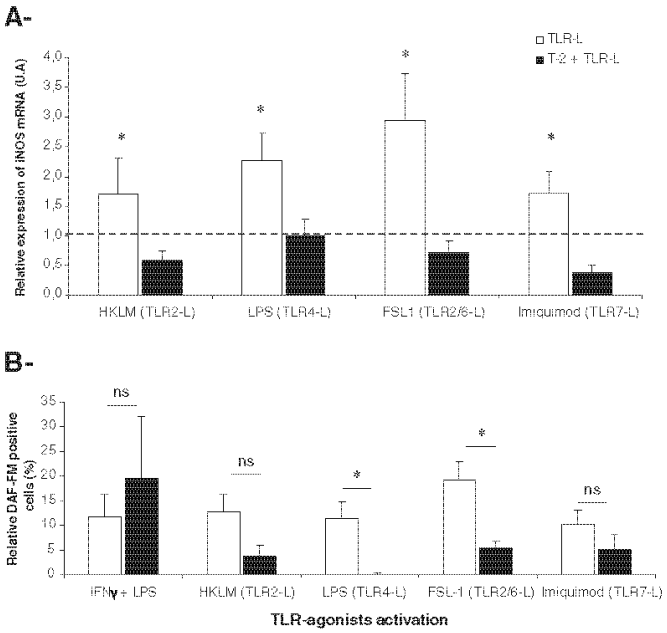


Figure 3 Analysis of relative expression of iNOS mRNA (A) and nitric oxide (NO) production (B) in PAM pre-treated with T-2 toxin. A- T-2 toxin affects iNOS mRNA expression: Relative mRNA expression of iNOS in PAM treated or not by 3 nM of T-2 toxin for 1 h before their activation with each specific TLR-agonist during 4 h. Data were analyzed with DART-PCR software and iNOS expression was normalized by the mean of two housekeeping genes (β2-microglobuline and RPL32). Gene expression of iNOS was reported to unstimulated PAM whose expression is visualized by the line level at 1. Significant differences ($P < 0.05$) between unstimulated PAM (negative control) and cells treated (with TLR-agonists in the absence or presence of T-2) are marked with an asterisk. B- T-2 toxin affects NO production: the cells were cultured for 1 h in the presence (black bars) or absence (white bars) of 3 nM of T-2 toxin before their activation with different TLR-agonists: TLR2-agonist (HKLM); TLR4-agonist (LPS); TLR2/6-agonist (FSL1) and TLR7-agonist (Imiquimod) for 16 h. An incubation of both cells and DAF-FM probe was used to determine the production of NO. Mean Fluorescence Intensity (MFI) of DAF-FM +/− SEM was determined by flow cytometry analysis and then normalized with the negative control. Mean (+/− SEM) of values obtained with PAM from five different piglets are shown. * indicates a P value < 0.05.

The current study indicates that the immune response implemented by alveolar macrophages is impaired by T-2 toxin. T-2 toxin is known to be cytotoxic and to induce apoptosis on immune cells like human monocytes, human dendritic cells and human and rat macrophages [10,28,38,39]. We observed that after 16 h exposure to T-2 toxin, the cell viability of PAM is affected by 10 nM of T-2 toxin and the IC_{50} value was evaluated near 20 nM. This concentration was in accordance with other studies on immune cells [10,40]. Cell death may be due

Table 2 Relative mRNA expression of TLR (−2, -4, -2/6 and −7) after T-2 toxin treatment in PAM

	negative control	TLR-L	T-2 + TLR-L
HKLM (TLR2-L)	1 +/− 0.14	76.92 +/− 16.67*	29.08 +/− 8.16 (*), (t)
LPS (TLR4-L)	1 +/− 0.11	17.69 +/− 4.80*	6.32 +/− 1.46 (*), (t)
FSL1 (TLR2/6-L)	1 +/− 0.22	259.90 +/− 75.91*	81.07 +/− 15.62 (*), (t)
Imiquimod (TLR7-L)	1 +/− 0.20	13.66 +/− 3.92*	7.03 +/− 1.66 (*)

Primary porcine cells (2×10^6 cells per mL) were exposed or not with 3 nM of T-2 toxin for 1 h before activation during 4 h at 39°C by different TLR-agonists: TLR2-agonist (HKLM); TLR4-agonist (LPS); TLR2/6-agonist (FSL1) and TLR7-agonist (Imiquimod). Relative expression of TLR genes was evaluated by quantitative real time PCR. Data were analyzed by DART-PCR software and gene expression was normalized by the mean of two housekeeping genes (RPL32 and β2-microglobuline). TLR gene expression was reported to unstimulated PAM. After checking for the normal distribution of data carried out with one-way ANOVA test, Student test was conducted to determine the differences among groups. The mean (+/− SEM) of the values obtained with PAM from five different piglets are shown. Significant differences ($P < 0.05$) between unstimulated cells (negative control) and cells treated by each TLR-L are marked with an asterisk (*). Significant differences ($P < 0.05$) between TLR-L-activated cells in the presence or not of T-2 toxin treatment are marked with (t).

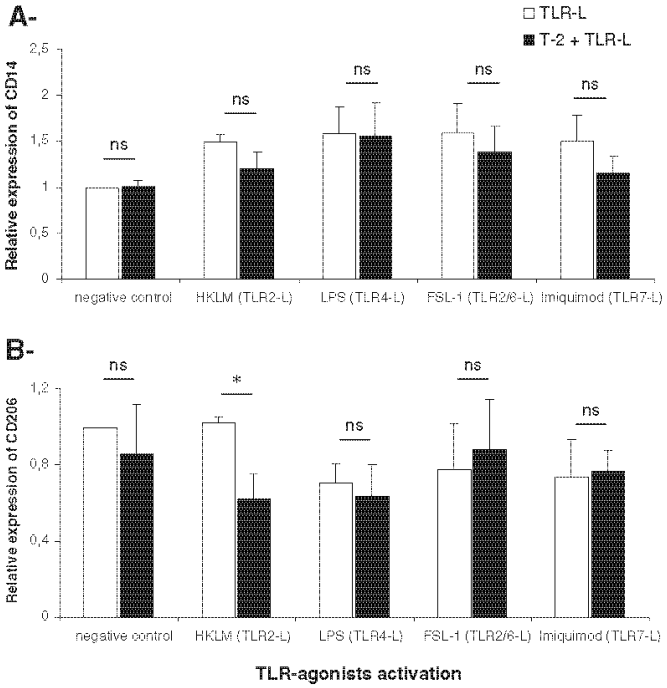


Figure 4 Effects of T-2 toxin on the expression of both cell surface receptor on macrophage: TLR4 co-receptor (CD14) and mannose receptor (CD206). Cells were cultured or not for 1 h in the presence (black bars) or absence (white bars) of 3 nM of T-2 toxin before their activation with different TLR-agonists: TLR2-agonist (HKLM); TLR4-agonist (LPS); TLR2/6-agonist (FSL1) and TLR7-agonist (Imiquimod) for 16 h at 39° C, 5% CO_2. Cells were collected and CD14 (A) and CD206 (B) staining were analyzed by flow cytometry. The mean of fluorescence intensity of both of these two markers was normalized to the negative control. Mean (+/− SEM) of values obtained with PAM from five different piglets are shown. * indicates a P value < 0.05

to necrosis or apoptosis. The T-2 toxin is known to induce the apoptosis pathway at varying concentrations depending on the targeted cells [38,39,41,42]. For example, in primary culture cells of hematopoietic progenitors, T-2 toxin induces apoptosis after 3 h of incubation with 10 nM of the toxin and a maximum reached at 12 h [43] while in macrophage cell lines (RAW 267.7), T-2 toxin induces less than 5% of apoptotic cells after 6 h of incubation with 5 nM of T-2 toxin [44]. The latter results are comparable to our data. A significant induction of apoptosis was shown with the exposure of 30 nM of T-2 toxin on PAM after 16 h of treatment. In order to avoid possible adverse effects due to cytotoxic and apoptotic process, a non cytotoxic and non apoptotic concentration of 3 nM of T-2 toxin was used for PAM activation studies. Moreover, the dose of 3 nM of T-2 toxin was relevant as a low dose and close to the provisional tolerable daily intake (TDI) of 100 ng / Kg bw / d [4].

Activated macrophages are the primary source of pro-inflammatory cytokines, including IL-1β and TNF-α [27,45]. Production of these two cytokines, in response to TLR-agonists and notably LPS, could be observed in the present study. Interestingly, after pre-treatment with low doses of T-2 toxin, a reduction of pro-inflammatory cytokine concentrations appeared dependent on the nature of the TLR-agonists. The IL-1β production was reduced after activation by the TLR2-agonist and significantly decreased after TLR4- and TLR6-agonist activation. By contrast, we did not observe a reduction of IL-1β production after activation of Pathogen Associated Molecular Patterns (PAM) by the TLR7-agonist. Similar results were observed regarding TNF-α response.

TLR expressed on antigen presenting cells (APC) such as macrophages, are critical for recognition of the PAMP on microorganisms and their abilities to induce appropriate immune responses. Extensive research on TLR has been performed in humans and rodents while only a few studies on porcine TLR have been completed. However, most of the studies on swine TLR have clearly demonstrated a correlation between the expression levels of TLR2 and TLR9 expressed in several tissues (lung, heart,

spleen, small intestine, mesenteric lymph nodes...) at the first stages of life and the capacity for newborn piglets to have an early efficient immune function [46,47]. Moreover, similar distribution of TLR on human and swine cells, unlike rodents, has been previously described [48]. Human alveolar macrophages have low TLR2 expression leading to a low production of TNF-α and IL-6 cytokines [49]. Similarly, the TLR2 expression level measured in human bronchoalveolar cells by Juarez et al. [49] could explain the low TNF-α protein concentration obtained in response to the TLR2-agonist in this study.

It is known that activation of macrophages by agonists, such as LPS, triggers the enhancement of expression of iNOS leading to NO production [26]. In the present investigation, a T-2 toxin pre-treatment induced a significant decrease of NO production in PAM activated by TLR4 and TLR2/6 agonists. However, this toxin did not affect NO production after activation of macrophages by either IFN-γ/LPS or TLR2 and −7 agonists. DON and nivalenol also affect the immune response by inhibiting NO production in mice macrophage cell lines in vitro (RAW264) [50]. In addition, this study demonstrated that there is a parallel between the decreasing of NO production and the decreasing of iNOS mRNA gene expression which could partially explain the effect of T-2 toxin on NO production.

Taken together, these results demonstrate the complexity of mycotoxin action depending on the cell activation status and mycotoxin doses. The TLR agonist-sensitized macrophage responds to subsequent toxin challenge with a robust and potentiated cytokine response. By contrast, our study showed that T-2 toxin pre-exposure inhibited naive macrophage to initiate an inflammatory response to TLR-ligands. This inhibition could be attributed to a defect of pathogen pattern recognition due to a T-2 toxin effect on TLR2, -4 and −2/6 expression. Due to a lack of commercially available antibodies for pigs, we could not verify the cell surface expression of these TLR. However, the present study showed that the importance of this inhibition seems to depend on the nature of the TLR. Indeed, the expression of TLR7 mRNA seemed less affected by the toxin. These results were consistent with the less inhibitory effect of T-2 toxin on the inflammatory response when PAM were activated by TLR7-agonist. This one is specifically located on the endosomal membrane and could explain that a T-2 toxin pre-exposure did not appear to disrupt the pro-inflammatory response.

The alteration of TLR expression could possibly influence the functions and efficacy of alveolar macrophages in terms of antigen processing and release of cytokines. It is tempting to speculate that the sensitized macrophage phenotype depends on both appropriate surface TLR expressions enabling the recognition of pathogen motifs and the appropriate induction of the cytokine signaling pathway. However, the effects of T-2 toxin seem to be TLR-receptor specific since neither co-receptor CD14 nor mannose receptor (CD206) were affected by the toxin. Our group has already shown in a previous study that DON can also inhibit cell surface expression of activation markers of human macrophages such as CD14, CD54, CD119 and HLA-DR [51].

Trichothecenes have the ability to modulate immune function by disrupting intracellular signaling pathways within leukocytes responsible for driving both altered immune-regulatory gene expression as well as apoptosis [52]. A review by Pestka et al. [53] demonstrated the preferential targeting of DON on the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPK), thereby leading to the modulation of immune responses and apoptosis [53]. In addition to specific intracellular localization of TLR7, the absence of T-2 toxin action on immune responses after TLR7 agonists activation can be explained by focusing on the specificity of TLR7-signaling pathways. In contrast to other TLR which involved both MAPK and canonical IKK complex for the transcription of inflammatory cytokine genes, TLR7 agonist activates only the IKKα signaling pathway to induce inflammatory cytokines [21].

Based on our finding that the T-2 toxin down-regulated the activation of TLR, it could be hypothesized that exposure to low concentrations of T-2 toxin may increase the susceptibility of humans and animals to opportunistic infections. The present study sheds new light on the potential of mycotoxins to interfere with the immune system by decreasing the expression pattern recognition of pathogens, and thus the initiation of immune responses against bacterial and viral infections. These results may help to explain the immunosuppressive effect of T-2 toxin observed in vivo during viral respiratory infection such as reovirus [15].

Given that food and feed are sometimes contaminated by T-2 and other trichothecenes, serious questions remain regarding risks from chronic ingestion of these toxins. Understanding the molecular mode of action of a mycotoxin can assist in predicting potential adverse human and animal health effects.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Morphologic and phenotypic characterization of PAM by flow cytometry using SWC3, SWC1, CD163, CD14, CD16, MHCII and DC-sign staining. This figure is a representative of three independent experiments.

Abbreviations

APC: Antigen presenting cells; ATP: Adenosine-5'-triphosphate; CD: Cluster of differentiation; DAF-FM diacetate: 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate; DON: Deoxynivalenol; FCCP: Carbonyl cyanid 4-trifluoromethoxy-phenylhydrasone; IFN-γ: Interferon gamma; IL-

1β: Interleukine 1 beta; iNOS: Induce nitric oxide synthase; LBP: LPS-binding protein; LPS: Lipopolysaccharide; MAPK: Mitogen-activated protein kinases; mRNA: Messenger ribonucleic acid; MyD88: Myeloïd differentiation primary response gene (88); NIV: Nivalenol; NO: Nitric oxide; PAM: Porcine alveolar macrophages; PAMP: Pathogen-associated molecular patterns; PCR: Polymerase chain reaction; PI: Propidium iodide; PRRs: Pattern recognizing receptors; RNA: Ribonucleic acid; SPRD: Porcine reproductive and respiratory syndrome; ssRNA: Single strand RNA; TNF-α: Tumor necrosis factor alpha; TLRs: Toll-like receptors; TLR-L: Toll-like receptors ligand or agonist.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements
JS and RS are grateful to the French Ministry for National Education and Research for providing a financial assistance to this study. The authors gratefully acknowledge Dr Glen Almond working for the pig health and production at the department of Population Health & Pathobiology (North Carolina State University) for valuable discussions of the manuscript and the linguistic correction of English and Dr Thierry Gauthier for the precious help in acquisition data about apoptosis and his implication in the final discussion. The authors are also grateful to Philippe Pinton and Anne-Marie Cossalter for their excellent technical assistance with piglets.

Authors' contributions
JS contributed to the acquisition, the analysis, the interpretation of cytotoxicity, transcriptomic and proteomic data and prepared the manuscript draft. RS has to take part in the design of this research and he carried out the statistical analysis. IPO contributed to the design but also took part in the drafting of the article and the critical revision of the important intellectual contents. LGP contributed to the acquisition, the analysis and the interpretation of flow cytometry, transcriptomic and proteomic data as well as coordination of the study and preparation of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 13 December 2011 Accepted: 24 April 2012
Published: 24 April 2012

References

1. CAST: Concil for Agricultural Science and Technology, Mycotoxins - Risks in plant, animal and human systems. Ames, (IA): Cast Task Force Report No. 139. 2003, 1–191.
2. Binder E, Tan L, Chin L, Handl J, Richard J: **Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients.** *Anim Feed Sci Technol* 2007, **137**:265–282.
3. Oswald IP, Comera C: **Immunotoxicity of mycotoxins.** *Revue Méd Vét* 1998, **149**:585–590.
4. EFSA: **Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed.** *EFSA J* 2011, **9**:2481.
5. Kokkonen M, Ojala L, Parikka P, Jestoi M: **Mycotoxin production of selected Fusarium species at different culture conditions.** *Int J Food Microbiol* 2010, **143**:17–25.
6. Van der Fels-Klerx HJ, Stratakou I: **T-2 toxin and HT-2 toxin in grain and grain-based commodities in Europe: occurence, factors affecting occurence, co-occurence and toxicological effects.** *World Mycotoxin J* 2010, **3**:349–367.
7. Nagata T, Suzuki H, Ishigami N, Shinozuka J, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K: **Development of apoptosis and changes in lymphocyte subsets in thymus, mesenteric lymph nodes and Peyer's patches of mice orally inoculated with T-2 toxin.** *Exp Toxicol Pathol* 2001, **53**:309–315.
8. Rafai P, Tuboly S, Bata A, Tilly P, Vanyi A, Papp Z, Jakab L, Tury E: **Effect of various levels of T-2 toxin in the immune system of growing pigs.** *Vet Rec* 1995, **136**:511–514.
9. Rafai P, Bata A, Vanyi A, Papp Z, Brydl E, Jakab L, Tuboly S, Tury E: **Effect of various levels of T-2 toxin on the clinical status, performance and metabolism of growing pigs.** *Vet Rec* 1995, **136**:485–489.
10. Hymery N, Leon K, Carpentier FG, Jung JL, Parent-Massin D: **T-2 toxin inhibits the differentiation of human monocytes into dendritic cells and macrophages.** *Toxicol In Vitro* 2009, **23**:509–519.
11. Meissonnier GM, Laffitte J, Raymond I, Benoit E, Cossalter AM, Pinton P, Bertin G, Oswald IP, Galtier P: **Subclinical doses of T-2 toxin impair acquired immune response and liver cytochrome P450 in pigs.** *Toxicology* 2008, **247**:46–54.
12. Tai JH, Pestka JJ: **T-2 toxin impairment of murine response to *Salmonella typhimurium*: a histopathologic assessment.** *Mycopathologia* 1990, **109**:149–155.
13. Ziprin RL, McMurray DN: **Differential effect of T-2 toxin on murine host resistance to three facultative intracellular bacterial pathogens: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Mycobacterium bovis*.** *Am J Vet Res* 1988, **49**:1188–1192.
14. Corrier DE, Wagner GG: **Comparison of the effect of T-2 toxin with that of dexamethasone or cyclophosphamide on resistance to *Babesia microti* infection in mice.** *Am J Vet Res* 1988, **49**:2000–2003.
15. Li M, Harkema JR, Islam Z, Cuff CF, Pestka JJ: **T-2 toxin impairs murine immune response to respiratory reovirus and exacerbates viral bronchiolitis.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2006, **217**:76–85.
16. Pinton P, Guzylack-Piriou L, Kolf-Clauw M, Oswald IP: **Effects of some fungal toxins, the trichothecenes, on the epithelial intestinal barrier.** *Curr Immunol Rev*, in press.
17. Bailey M: **The mucosal immune system: recent developments and future directions in the pig.** *Dev Comp Immunol* 2009, **33**:375–383.
18. Laskin DL, Weinberger B, Laskin JD: **Functional heterogeneity in liver and lung macrophages.** *J Leukoc Biol* 2001, **70**:163–170.
19. Benoit M, Desnues B, Mege JL: **Macrophage polarization in bacterial infections.** *J Immunol* 2008, **181**:3733–3739.
20. Laskin DL, Sunil VR, Fakhrzadeh L, Groves A, Gow AJ, Laskin JD: **Macrophages, reactive nitrogen species, and lung injury.** *Ann N Y Acad Sci* 2010, **1203**:60–65.
21. Kumar H, Kawai T, Akira S: **Toll-like receptors and innate immunity.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **388**:621–625.
22. Kawai T, Akira S: **The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition.** *Int Immunol* 2009, **21**:317–337.
23. Creagh EM, O'Neill LA: **TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity.** *Trends Immunol* 2006, **27**:352–357.
24. Uematsu S, Akira S: **Innate immune recognition of viral infection.** *Uirusu* 2006, **56**:1–8.
25. Manicassamy S, Pulendran B: **Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors.** *Semin Immunol* 2009, **21**:185–193.
26. Shimomura-Shimizu M, Sugiyama K, Muroi M, Tanamoto K: **Alachlor and carbaryl suppress lipopolysaccharide-induced iNOS expression by differentially inhibiting NF-kappaB activation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **332**:793–799.
27. Kankkunen P, Rintahaka J, Aalto A, Leino M, Majuri ML, Alenius H, Wolff H, Matikainen S: **Trichothecene mycotoxins activate inflammatory response in human macrophages.** *J Immunol* 2009, **182**:6418–6425.
28. Sorenson WG, Gerberick GF, Lewis DM, Castranova V: **Toxicity of mycotoxins for the rat pulmonary macrophage in vitro.** *Environ Health Perspect* 1986, **66**:45–53.
29. Meissonnier GM, Pinton P, Laffitte J, Cossalter AM, Gong YY, Wild CP, Bertin G, Galtier P, Oswald IP: **Immunotoxicity of aflatoxin B1: impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2008, **231**:142–149.
30. Meurens F, Girard-Misguich F, Melo S, Grave A, Salmon H, Guillen N: **Broad early immune response of porcine epithelial jejunal IPI-2I cells to *Entamoeba histolytica*.** *Mol Immunol* 2009, **46**:927–936.
31. Alves MP, Neuhaus V, Guzylack-Piriou L, Ruggli N, McCullough KC, Summerfield A: **Toll-like receptor 7 and MyD88 knockdown by lentivirus-mediated RNA interference to porcine dendritic cell subsets.** *Gene Ther* 2007, **14**:836–844.
32. Pinton P, Braicu C, Nougayrede JP, Laffitte J, Taranu I, Oswald IP: **Deoxynivalenol impairs porcine intestinal barrier function and decreases the protein expression of claudin-4 through a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism.** *J Nutr* 2010, **140**:1956–1962.
33. Arce C, Ramirez-Boo M, Lucena C, Garrido JJ: **Innate immune activation of swine intestinal epithelial cell lines (IPEC-J2 and IPI-2I) in response to LPS from *Salmonella typhimurium*.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2008, **33**:161–174.
34. Devriendt B, Gallois M, Verdonck F, Wache Y, Bimczok D, Oswald IP, Goddeeris BM, Cox E: **The food contaminant fumonisin B(1) reduces the maturation of porcine CD11R1(+) intestinal antigen presenting cells and**

antigen-specific immune responses, leading to a prolonged intestinal *ETEC* infection. *Vet Res* 2009, **40**:40.
35. Halloy DJ, Kirschvink NA, Mainil J, Gustin PG: **Synergistic action of *E. coli endotoxin* and *Pasteurella multocida* type A for the induction of bronchopneumonia in pigs.** *Vet J* 2005, **169**:417–426.
36. Basta S, Gerber H, Schaub A, Summerfield A, McCullough KC: **Cellular processes essential for African swine fever virus to infect and replicate in primary macrophages.** *Vet Microbiol* 2010, **140**:9–17.
37. Nauwynck HJ, Duan X, Favoreel HW, Van Oostveldt P, Pensaert MB: **Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis.** *J Gen Virol* 1999, **80**:297–305.
38. Ueno Y, Umemori K, Niimi E, Tanuma S, Nagata S, Sugamata M, Ihara T, Sekijima M, Kawai K, Ueno I, Tashiro F: **Induction of apoptosis by T-2 toxin and other natural toxins in HL-60 human promyelotic leukemia cells.** *Nat Toxins* 1995, **3**:129–137.
39. Sugamata M, Hattori T, Ihara T, Okumura H, Yoshino N, Ueno Y: **Fine structural changes and apoptotic cell death by T-2 mycotoxin.** *J Toxicol Sci* 1998, **23(Suppl 2)**:148–154.
40. Huang P, Akagawa K, Yokoyama Y, Nohara K, Kano K, Morimoto K: **T-2 toxin initially activates caspase-2 and induces apoptosis in U937 cells.** *Toxicol Lett* 2007, **170**:1–10.
41. Islam Z, Nagase M, Yoshizawa T, Yamauchi K, Sakato N: **T-2 toxin induces thymic apoptosis in vivo in mice.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1998, **148**:205–214.
42. Schuhmacher-Wolz U, Heine K, Schneider K: **Scientific report submitted to EFSA. Report on toxicity data on trichothecene mycotoxins HT-2 and T-2 toxin.** [http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/65e.pdf.]
43. Le Drean G, Auffret M, Batina P, Arnold F, Sibiril Y, Arzur D, Parent-Massin D: **Myelotoxicity of trichothecenes and apoptosis: an in vitro study on human cord blood CD34+ hematopoietic progenitor.** *Toxicol In Vitro* 2005, **19**:1015–1024.
44. Yang GH, Jarvis BB, Chung YJ, Pestka JJ: **Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p38 MAPK, and SAPK/JNK activation.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2000, **164**:149–160.
45. Doll S, Schriclx JA, Danicke S, Fink-Gremmels J: **Deoxynivalenol induced cytotoxicity, cytokines and related genes in unstimulated or lipopolysaccharide stimulated primary porcine macrophages.** *Toxicol Lett* 2009, **184**:97–106.
46. Shimosato T, Tohno M, Kitazawa H, Katoh S, Watanabe K, Kawai Y, Aso H, Yamaguchi T, Saito T: **Toll-like receptor 9 is expressed on follicle-associated epithelia containing M cells in swine Peyer's patches.** *Immunol Lett* 2005, **98**:83–89.
47. Tohno M, Shimosato T, Moue M, Aso H, Watanabe K, Kawai Y, Yamaguchi T, Saito T, Kitazawa H: **Toll-like receptor 2 and 9 are expressed and functional in gut-associated lymphoid tissues of presuckling newborn swine.** *Vet Res* 2006, **37**:791–812.
48. Guzylack-Piriou L, Balmelli C, McCullough KC, Summerfield A: **Type-A CpG oligonucleotides activate exclusively porcine natural interferon-producing cells to secrete interferon-alpha, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-12.** *Immunology* 2004, **112**:28–37.
49. Juarez E, Nunez C, Sada E, Ellner JJ, Schwander SK, Torres M: **Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes.** *Respir Res* 2010, **11**:2.
50. Sugiyama K, Muroi M, Tanamoto K, Nishijima M, Sugita-Konishi Y: **Deoxynivalenol and nivalenol inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by mouse macrophage cells.** *Toxicol Lett* 2010, **192**:150–154.
51. Wache YJ, Hbabi-Haddioui L, Guzylack-Piriou L, Belkhelfa H, Roques C, Oswald IP: **The mycotoxin deoxynivalenol inhibits the cell surface expression of activation markers in human macrophages.** *Toxicology* 2009, **262**:239–244.
52. Pestka JJ, Zhou HR, Moon Y, Chung YJ: **Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox.** *Toxicol Lett* 2004, **153**:61–73.
53. Pestka JJ: **Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis.** *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2008, **25**:1128–1140.

doi:10.1186/1297-9716-43-35
Cite this article as: Seeboth *et al.*: 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. *Veterinary Research* 2012 **43**:35.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

ETUDE 2 :

Effet des trichothécènes sur la balance immunitaire intestinale IL-17/Tregs dans le modèle porcin

Dans cette étude, l'effet des trichothécènes (DON et toxine T-2) sur la réponse inflammatoire au niveau du GALT a été étudié. Responsables de nécroses au niveau des tissus hématopoïétiques et des organes lymphoïdes, les trichothécènes sont connus pour être de puissants immunomodulateurs, leurs cibles privilégiées étant les cellules du système immunitaire. La réponse immunitaire intestinale repose sur une délicate balance entre la réponse inflammatoire caractérisée par la production d'IL-17 (par les cellules productrices d'IL-17 à savoir, les cellules Th17, les cellules Tγδ-IL-17$^+$, ILC17, les cellules NKT-IL-17$^+$ et la réponse anti-inflammatoire ou régulatrice de cette réponse effectrice faisant intervenir les cellules T régulatrices.

L'effet du DON et de la toxine T-2 sur les acteurs principaux de cet équilibre immunitaire intestinale a été déterminé, à savoir les cellules T productrices d'IL-17 et les cellules anti-inflammatoires T régulatrices (Tregs) mais également sur les cellules immuno-compétentes capables de moduler cette balance : les cellules dendritiques et les IECs. Cette étude a été divisée en deux étapes : la première étape a consisté en une analyse descriptive de l'effet du DON sur le profil cytokinique à travers une étude transcriptomique de la réponse inflammatoire intestinale via l'utilisation de 3 modèles d'exposition différents (*in vitro, ex vivo* et *in vivo*). La seconde étape a consisté à comparer les effets du DON et de la toxine T-2 sur le profil d'expression de certaines cytokines intervenant dans l'homéostasie intestinale en utilisant le modèle *ex vivo* d'explants intestinaux, puis de tenter de décortiquer les mécanismes induits par ces toxines à l'aide de différents modèles cellulaires et outils méthodologiques: l'utilisation de lignée de cellules épithéliales, la maturation de MoDCs et le phénotypage de sous-populations de lymphocytes issus de PBMCs.

I. Effet du déoxynivalénol

Dans la première partie de cette seconde étude, l'effet du DON sur la réponse inflammatoire au niveau du GALT a été évalué.

Ce travail a donné lieu à la publication suivante parue dans **Plos One (IP : 3,73):**

Julie Seeboth[*], Patricia M. Cano*, François Meurens, Juliette Cognie, Roberta Abrami, Isabelle P. Oswald, Laurence Guzylack-Piriou 2012. *These authors contributed equally. Deoxynivalenol as a new factor in the persistence of intestinal inflammatory diseases: an emerging hypothesis through possible modulation of Th17-mediated response (PlosOne).

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Deoxynivalenol as a New Factor in the Persistence of Intestinal Inflammatory Diseases: An Emerging Hypothesis through Possible Modulation of Th17-Mediated Response

Patricia M. Cano[1,2☯], Julie Seeboth[1,2☯], François Meurens[3,6], Juliette Cognie[4], Roberta Abrami[1,2,5], Isabelle P. Oswald[1,2]*, Laurence Guzylack-Piriou[1,2]*

1 INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, Toulouse, France, **2** Université de Toulouse, INPT, UMR1331, Toxalim, Toulouse, France, **3** INRA, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, Nouzilly, France, **4** INRA, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly, France, **5** Universidade Estadual de Londrina, Lab Patologia Animal, Londrina, Brazil, **6** Vaccine and Infectious Disease Organization, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada

Abstract

Background/Aims: Deoxynivalenol (DON) is a mycotoxin produced by *Fusarium* species which is commonly found in temperate regions worldwide as a natural contaminant of cereals. It is of great concern not only in terms of economic losses but also in terms of animal and public health. The digestive tract is the first and main target of this food contaminant and it represents a major site of immune tolerance. A finely tuned cross-talk between the innate and the adaptive immune systems ensures the homeostatic equilibrium between the mucosal immune system and commensal microorganisms. The aim of this study was to analyze the impact of DON on the intestinal immune response.

Methodology: Non-transformed intestinal porcine epithelial cells IPEC-1 and porcine jejunal explants were used to investigate the effect of DON on the intestinal immune response and the modulation of naive T cells differentiation. Transcriptomic proteomic and flow cytometry analysis were performed.

Results: DON induced a pro-inflammatory response with a significant increase of expression of mRNA encoding for IL-8, IL-1α and IL-1β, TNF-α in all used models. Additionally, DON significantly induced the expression of genes involved in the differentiation of Th17 cells (STAT3, IL–17A, IL-6, IL-1β) at the expenses of the pathway of regulatory T cells (Treg) (FoxP3, RALDH1). DON also induced genes related to the pathogenic Th17 cells subset such as IL–23A, IL-22 and IL-21 and not genes related to the regulatory Th17 cells (rTh17) such as TGF-β and IL-10.

Conclusion: DON triggered multiple immune modulatory effects which could be associated with an increased susceptibility to intestinal inflammatory diseases.

Citation: Cano PM, Seeboth J, Meurens F, Cognie J, Abrami R, et al. (2013) Deoxynivalenol as a New Factor in the Persistence of Intestinal Inflammatory Diseases: An Emerging Hypothesis through Possible Modulation of Th17-Mediated Response. PLoS ONE 8(1): e53647. doi:10.1371/journal.pone.0053647

Editor: Niels Olsen Saraiva Câmara, Universidade de Sao Paulo, Brazil

Received May 29, 2012; **Accepted** December 3, 2012; **Published** January 10, 2013

Copyright: © 2013 Cano et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Patricia Cano, Julie Seeboth and Roberta Abrami were supported by a doctoral fellowships financed by INRA and ANSES (France), the Ministry for Education and Research (France), CAPES-COFECUB (Brazil) respectively. This study was supported by the EU projects INTERPLAY (FP7-KBBE-KBBE-2008–2B), MycoRed (FP7-KBBE-2007–2A) and by a grant for newly recruited scientist from INRA-Division of animal health. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: laurence.guzylack@toulouse.inra.fr (LGP); isabelle.oswald@toulouse.inra.fr (IPO)

☯ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Mycotoxins are fungal secondary metabolites that commonly contaminate human food and animal feed. Given their global and frequent occurrence, their stability through the food processing chain [1] as well as their known toxic effects, mycotoxins have become a major concern in Europe and North America. Their effects on humans and domestic animals range from decreased resistance to infectious diseases and growth impairment, to cancer induction and death [2,3,4].

Deoxynivalenol (DON) is a mycotoxin of the trichothecenes family mainly produced by *Fusarium graminearum* and *F. culmorum*. Although it is not the most acutely toxic trichothecene, DON is regarded as an important food safety issue since it is the most prevalent trichothecene in wheat, corn, barley and their by-products in Europe and North America [5,6]. Toxicity of DON has been largely demonstrated for humans and all animal species tested [7] but swine, which are readily exposed to this toxin through their cereal-rich diet, are the most sensitive [8]. Therefore they make an excellent research model for animal and even human exposure to DON due to higher similarities concerning the digestive and the immune system than other animal models [9,10]. Acute exposure to high doses of DON results in diarrhea,

vomiting, leukocytosis, gastrointestinal hemorrhage and ultimately death whereas chronical exposure to low doses of this toxin induces anorexia, reduced weight gain and altered nutritional efficiency [7].

This toxin specifically targets dividing cells such as intestinal epithelial cells and immune cells [11]. It can alter the expression of transcription factors by readily binding to the ribosomes and rapidly activating mitogen-activated protein kinases (MAPKs), thus possibly affecting cytokines production and membrane receptors [12].

The intestinal tract is the first physical barrier against food contaminants, chemicals and intestinal pathogens and as such, it plays an important role in the regulation of the immune response to these intrusions. Previous studies have demonstrated that intestinal absorbance of DON takes mainly place in the jejunum both directly from the intestinal lumen to the apical side of the intestinal epithelium and also indirectly through already absorbed toxin reaching the intestinal epithelial cells (IECs) from the blood stream to the basolateral side [13]. Low doses of this toxin can induce morphological and histological impairments of IECs such as atrophy and fusion of the villi [14,15]. It can also decrease the number of goblet cells [14] and alter the intestinal permeability by repressing the expression of tight junction proteins such as claudins 3-4, ZO-1 and occludin [14,16,17,18]. Basolateral exposure to DON recently showed to have a more severe impact on the intestinal barrier integrity and DNA fragmentation than apical exposure [19].

As a defense mechanism, the intestinal epithelial cells are able to produce several pro-inflammatory cytokines such as the tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), interleukin (IL)-6 and different chemokines such as IL-8 and the CC-chemokine ligand (CCL)-20 that are crucial for the recruitment and activation of the underlying immune cells of the *lamina propria* [20]. IECs also have a particularly close interaction with dendritic cells (DCs) that play an essential role in the initiation of the adaptive immune response mediated for the most part by $CD4^+$ T helper (Th) cells. Depending on the local intestinal environment, different populations of DCs shape the immune response by activating naive T cells and inducing their differentiation into specific effector T cell populations [21]. Against intracellular infections, Th1 cells are induced to secrete interferon-gamma (IFN-γ) and IL-12 and regulate cellular immunity. DCs are also strongly implicated in the maintenance of tolerance by inducing T regulatory cells (Tregs) that secrete IL-10 and the tumor growth factor beta (TGF-β). Another subset of T helper lymphocytes, the Th17, was recently described as an important mediator of mucosal immunity, defense against extracellular pathogens and autoimmunity [22]. Interestingly, Th17 cells have been related to both pathogenic and regulatory responses, which are generated by two distinct populations of Th17 with a common signature cytokine, IL-17A [23,24]. The dichotomy of Th17 cells results from different stimuli: IL-6, IL-1β and IL-23 promote the expression of pro-inflammatory cytokines by the so-called pathogenic Th17 whereas IL-6 and TGF-β restrain the pathogenic potential of these cells by inducing the production of IL-10 by regulatory Th17 (rTh17) [23,24]. The same plasticity allows induced Tregs to reverse their phenotype and acquire the functions of pathogenic Th17 when cultured with IL-6 [25]. Plasticity of T lymphocytes ensures the adequacy of the immune response to an offensive situation and is critical to maintain the balance between protection and homeostasis. All of this relies on a well-established communication between IECs, DCs and the different T helper cell subsets. The damages caused to the intestinal epithelium by exposure to DON could disrupt these interactions and thus lead to severe disturbances of the intestinal immune system. Taken together, all of this could lead to persistent tissue inflammation and eventually, to chronic intestinal inflammatory diseases such as intestinal bowel disease (IBD) characterized by a dysfunctional intestinal barrier and autoimmune responses. DON could play a role in the induction and/or persistence of such inflammatory diseases [26]. However it is noteworthy that few publications have paid attention to the intestinal effects of DON, and even less to the effect of DON on the above mentioned balance between T cells populations.

The aim of this study was to analyze the influence of a low but relevant concentration of DON on the cytokines levels produced by the different subsets of intestinal T lymphocytes using three methodological approaches: *in vitro*, a non transformed porcine intestinal epithelial cell line (IPEC-1) [16,17] and e*x vivo* porcine intestinal explants [27].

Materials and Methods

Chemicals

Purified DON stock (Sigma Aldrich, Ayshire, UK) was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and stored at −20°C before dilution in complete cell culture media. Control samples were treated with equivalent concentrations of DMSO, which were non cytotoxic.

Treatment of the Intestinal Epithelial Cell Line IPEC-1

The Intestinal Porcine Epithelial cell line (IPEC-1) was derived from the small intestine of a newborn unsuckled piglet [28]. IPEC-1 cells are capable of differentiating into mature enterocytes to form a uniform and polarized epithelial layer that suitably mimics the intestinal epithelial barrier and its apico-basolateral discrimination. They have been largely previously used to study bacterial infections, intestinal epithelial integrity, and trans-epithelial transport [18,29,30].

IPEC-1 cells were grown and differentiated as previously described [31]. Briefly, cells were seeded into 4.2 cm^2 polyethylene terephtalate membrane inserts with 0.4 µm pore size (Beckon Dickinson, Pont de Claix, France) at 2 x 10^5 cells per well in 2 ml of growth media. Treatments were applied to the apical compartments of the inserts.

IPEC-1 cells were incubated for 1.5 h, 4 h, 8 h, 12 h or 24 h in the presence of 10 µM of DON or DMSO at 39°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2. After treatment, supernatants were collected to evaluate cytokine production and cells were harvested for transcriptional analysis.

Treatment of Explants Cultures

All animal experiments were carried out in accordance with European Guidelines for the Care and Use of Animals for Research Purposes. Jejunal tissue was obtained from six piglets which were 5 week-old, 7 days after weaning. Animals were fed ad libitum prior to the experiment. A 5 cm middle jejunum segment was collected in pre-warmed Williams media (Sigma) supplemented with 200 U/mL penicillin and 200 µg/mL streptomycin (Eurobio, Courtaboeuf, France). It was washed twice and opened longitudinally. Then, the external *tunica muscularis* was removed and explants were made with punch trocards (centravet, Lapalisse, France) and were placed in Williams culture media supplemented with 1% of penicillin/streptomycin, 0.5% of gentamycine (Eurobio), 4.5 g/L of glucose (Sigma), 10% FBS (Eurobio) and 30 mM of amino acid (Ala/Glu) (Eurobio). Pig jejunal explants were incubated with 10 µM of DON or DMSO for 4 h, 8 h or 12 h at 39°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2. After treatment, tissues were collected for transcriptional analysis.

IL-8, IL-1 Alpha and IL-17 Cytokine Assays

Concentrations of IL8 and IL-1 alpha were measured by enzyme linked immuno-absorbent assays (ELISA) using specific kits for porcine IL8 and IL-1 alpha (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Plates were washed with PBS/Tween 20 and then blocked with PBS containing 1% BSA (w/v) for 1 h at room temperature (RT). Supernatant samples were added to the ELISA plate in duplicate and incubated for 2 h at RT. After washing, wells were incubated with biotinylated specific detection antibodies for porcine IL8 and porcine IL1-alpha (R&D Systems) for 2 h at RT. Then, streptavidin-HRP-conjugated antibody (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) was added for 30 min at 37°C. Positive reactions were revealed by 3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine (TMB) (Thermo Fisher Scientific) and reactions were stopped with H_2SO_4 2 N. The optical density (OD) was read at 450 nm.

Cytokine IL-17 was measured using the swine IL-17A VetSet™ ELISA Development kits (Kingfisher biotech, St.Paul, MN, USA).

RNA Extraction and Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) Analysis

Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed to determine the relative mRNA expression levels of chemokines, interleukins, chemokines receptors, enzymes, and several transcription factors involved in the modulation of the intestinal immune response. Total RNA from IPEC-1 cultures and jejunal explants was extracted with Trizol Reagent (Extract all, Eurobio). RNA concentration, integrity and quality were determined spectrophotometrically using Nanodrop ND1000 (Labtech International, Paris, France). RIN of these mRNA fluctuated between 6.80 and 4.70 for 4 hours and 12 hours of culture times, respectively. Then, reverse transcription and real-time qPCR steps were performed as previously described [32]. Non-reverse transcripted RNA was used as non-template control for verification of genomic DNA amplification signal. Specificity of qPCR products was assessed at the end of the reactions by analyzing dissociation curves. Primers were purchased from Invitrogen (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Paisley, UK). Specific sequences were specified in tableô 1. Amplification efficiency and initial fluorescence were determined by the ΔΔCt method, then obtained values were normalized using two reference genes, ribosomal protein L32 (RPL32) and cyclophilline A [33]. Stability of these genes was demonstrated previously in intestinal tissues [34]. mRNA expression levels were expressed relative to the mean of the control group at 4 h of exposure to DMSO alone.

Analysis of T Regulatory Cells Phenotype in Lamina Propria Cultured With DON

Leucocytes were isolated from jejunal lamina propria harvested from two pigs by collagenase digestion as described previously [35]. Briefly, pieces of small intestine were incubated for 2 times 45 min in several changes of calcium and magnesium-free Hank's balanced salt solution (HBSS), containing 1 mM of ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) at 37°C on a shaking platform. This procedure largely removed the epithelial layer. The remaining tissue was then digested in RPMI-1640 containing 0.36 g/ml of collagenase (Collagenase Grade V, Sigma), 10% of FBS, 20 mM of Hepes (Eurobio, Paris, France) and 2000 U/ml of Dnase1 (Roche diagnostics, Mannheim, Germany) at 37°C for 1 h on a shaking platform. Cells were suspended in a 40% Percoll in RPMI solution and underlaid with a 80% Percoll solution (Pharmacia, Uppsala, sweden). Low-density cells were recovered from the 40%/80% gradient interface. Cell suspensions isolated from lamina propria were cultured with different concentration of DON: 0.1 to 10 mM for 48 h at 39°C.

Following 2 days of culture, lymphocytes were evaluated for their expression of CD4, CD25, and FoxP3 using flow cytometry. Briefly, cells were first stained with mouse anti-porcine CD4 (clone MIL17, ACRIS, Herford, Germany) and mouse anti-porcine CD25 (AbD Serotec, Colmar, France). As secondary antibodies isotype-specific fluorochrome- or biotin-labelled goat anti-mouse antibodies (αIgG1-Alexa 488, αIgG2b-biotin (Invitrogen) were used. Biotin-labelled secondary antibodies were further marked with APC-Cy7 streptavidin conjugate (Invitrogen). For intracellular staining, cells were permeabilized with a FoxP3 permeabilization/fixation buffer kit followed by staining with anti-mouse/rat FoxP3-PE that reacts with porcine FoxP3 (eBioscience Inc., San Diego, CA). Flow cytometric analysis was conducted on the lymphocytes using a MACSQuant analyser (Miltenyi biotech, Paris, France) and Venturi solfware. Dendritic cells were excluded based on forward and side scatter.

Statistics

After checking of normal distribution of data, we performed Fisher test and Student's t-test to compare values between multiple groups. The statistical analysis of the data was carried out with Statview software (Statistical Analysis System; SAS for Windows 98; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Differences were considered to be statistically significant when the p-value was lower than 0.05.

Results

DON potentiated the expression of immune genes and increased protein concentration in differentiated IPEC-1 cells in a time-dependent manner.

We initially aimed to investigate the effects of DON on gene expression and protein production involved in the inflammatory immune response. Characterization of DON immune modulatory effects was first assessed by mRNA expression analysis in intestinal epithelial cells (IPEC-1) (Fig.ô 1). In untreated cells, no statistical difference in mRNA expression was measured between the different times of exposure, reflecting the absence of spontaneous inflammation caused by extended culture time. Exposure to DON significantly increased the expression of pro-inflammatory and regulatory cytokines, chemokines and of the enzyme RALDH (Fig.ô 1A). Early up-regulation in response to DON treatment was observed for IL-8, IL-1α and CCL20. Expression of these genes reached a maximum level after 4 h of DON exposure (100, 14 and 18 fold increase, respectively). mRNA expression levels of these three cytokines decreased in the course of time but remained significantly up-regulated until 24 h of DON exposure. These responses were correlated with IL-8 and IL-1α protein levels which were significantly up-regulated after 8 h of DON exposure (Fig.ô 1B). In addition to these early expressed genes, TGF-β, CX3CL1 and RALDH1 were also significantly increased but only after 8 h of exposure to DON (Fig.ô 1A).

Differentiated IPEC-1 cells were cultured in presence (black squares/bars) or absence (white diamonds/gray bars) of 10 μM of DON for 1.5 h, 4 h, 8 h, 12 h or 24 h. Gene expression was analyzed by RT-qPCR and protein levels by ELISA. Gene expressions were normalized by the mean of two reference genes (Cyclophilin A and RPL32). Data are presented as means +/− SEM of values obtained with three independent experiments. mRNA values are expressed relative to the control group at 4 h. Asterisks denote significant differences between groups: * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

Table 1. List of genes, primers sequences (F: Forward; R: Reverse) and accession numbers and references.

Gene Symbol	Gene name	Primer sequence	References
IL1-α	Interleukin 1 - alpha	F: TCAGCCGCCCATCCAA	NC_010445.3
		R: AGCCCCGGTGCCATGT	
IL1-β	Interleukin 1 - beta	F: GAGCTGAAGGCTCTCCACCTC	NM_001005149
		R: ATCGCTGTCATCTCCTTGCAC	
TNF-α	Tumor necrosis factor - alpha	F: ACTGCACTTCGAGGTTATCGG	NM_214022
		R: GGCGACGGGCTTATCTGA	[32]
IL6	Interleukin 6	F: GGCAAAAGGGAAAGAATCCAG	NM_214399
		R: CGTTCTGTGACTGCAGCTTATCC	[68]
IL8	Interleukin 8	F: GCTCTCTGTGAGGCTGCAGTTC	NM_213867
		R: AAGGTGTGGAATGCGTATTTATGC	[14]
IL10	Interleukin 10	F: GGCCCAGTGAAGAGTTTCTTTC	NM_214041
		R: CAACAAGTCGCCCATCTGGT	[14]
IL12-p40	Interleukin 12 p40	F: GGTTTCAGACCCGACGAACTCT	NM_214013
		R: CATATGGCCACAATGGGAGATG	
IL17α	Interleukin 17 - alpha	F: CCAGACGGCCCTCAGATTAC	AB102693
		R: CACTTGGCCTCCCAGATCAC	[69]
IL21	Interleukin 21	F : GGCACAGTGCCCCATAAATC	MN_214415
		R: GCAGCAATTCAGGGTCCAAG	[70]
IL22	Interleukin 22	F: AAGCAGGTCCTGAACTTCAC	AY937228
		R: CACCCTTAATACGGCATTGG	[69]
IL23A	Interleukin 23 - alpha	F: GAGAAGAGGGAGATGATGAGACTACA	[66]
		R: GGTGGATCCTTTGCAAGCA	
TGF-β	Transforming growth factor - beta	F: GAAGCGCATCGAGGCCATTC	X54859
		R: GGCTCCGGTTCGACACTTTC	[69]
CCL20/MIP3 alpha	Chemokine (CCL20)	F: GCTCCTGGCTGCTTTGATGTC	NM_001024589
		R: CATTGGCGAGCTGCTGTGTG	[66]
IFN-γ	Interferon - gamma	F: TGGTAGCTCTGGGAAACTGAATG	NM_213948
		R: GGCTTTGCGCTGGATCTG	[66]
ROR-γ like	Nuclear receptor ROR-gamma-like	F: CCTGGCCCTGGGCATGT	NC_010446.3
		R: TGTTCTAGCAGCGTCCGAAGT	
FoxP3	Forkhead box P3	F: GGTGCAGTCTCTCTGGAACAA	AY669812
		R: GGTGCCAGTGGCTACAATAC	[66]
CX3CL1/Fractalkine	Chemokine (CX3CL1)	F: GCAGCTCCTAGTCCATTAC	EST CK464144
		R: CACCATTCTGACCCAAAG	[66]
XCR1	Chemokine (XCR1)	F: TCTTCTGCAAGCTTCTCAACATC	[66]
		R: GGCTGACCACGGACAGGTA	
CCR6	Chemokine (CCR6)	F: CCTGCACTGCTGCCTCAA	[71]
		R: TTCAGAAAGTAGCTCCGGAA	
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	F: TGCAGCAGAAAGTGAGCTAC	MN_001044580
		R: CCGGTCTTGATGACTAATGG	[22]
RALDH1	Retinaldehyde deshydrogenase 1	F: TGGAGTGTGTGGCCAGATCA	N-010460-3
		R: GCAGGCCCTATCTTCCAAATG	[72]
T-bet	T-cell beta chain Th17-Th22 like	F: TTTGTGGCCTTTTGCATCCT	Present study
		R: CCTGTGTTTGTGATCTTGTTCCTT	
Cyclo A	Cyclophilin A	F: CCCACCGTCTTCTTCGACAT	MN_214353
		R: TCTGCTGTCTTTGGAACTTTGTCT	[22]
RPL32	Ribosomal Protein L32	F: AGTTCATCCGGCACCAGTCA	MN_001001636
		R: GAACCTTCTCCGCACCCTGT	[16]

doi:10.1371/journal.pone.0053647.t001

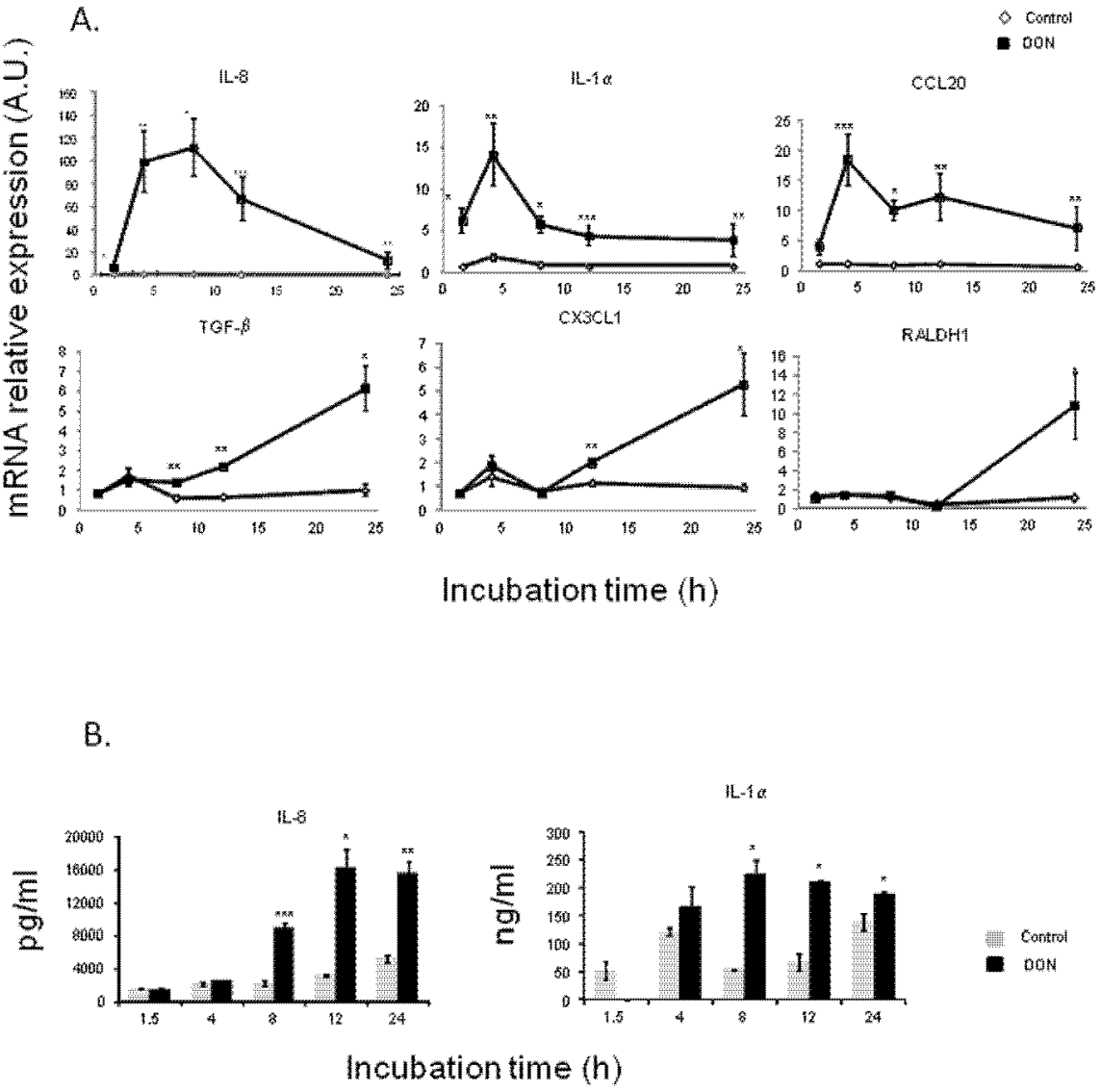


Figure 1. Deoxynivalenol induced cytokines and chemokines mRNA relative expression (A) and protein concentration (B) in IPEC-1 cells.
doi:10.1371/journal.pone.0053647.g001

DON increased relative mRNA Expression Levels of Both pro-Inflammatory Cytokines and DC-Recruiting Chemokines in an *ex vivo* Model of Porcine jejunal Explants

In order to get an insight on the impact of DON on the cross-talk between epithelial cells and immune cells and its impact on the emergence of the mucosal immune response, porcine jejunal explants were exposed to 10 µM of DON. After 4 h, DON exposure induced an up-regulation of mRNA expression of pro-inflammatory cytokines (IL-8, IL-1α and TNF-α) as well as DC-recruiting chemokines (CCL20, CCR6, CX3CL1 and XCR1) (Fig.ô 2). Concerning pro-inflammatory cytokines, two different kinetics appeared again. The increase of both IL-8 and IL-1α was progressive in a time dependent manner and these cytokines reached their highest expression levels after 12 h (12 and 13 fold induction, respectively) (Fig.ô 2A). On the contrary, the significant up-regulation of TNF-α kept more or less steady along the different time points. An additional experiment involving jejunal loops of a 5 week-old pig *in vivo* to 10 µM of DON, suggested a decrease in the expression of these pro-inflammatory cytokines after 24 h of exposure (Fig. S1).

The expression of DC-recruiting chemokines was also measured in our explants model to analyze the effect of DON on CCL20/CCR6-mediated signals which can induce chemotaxis of CCR6-

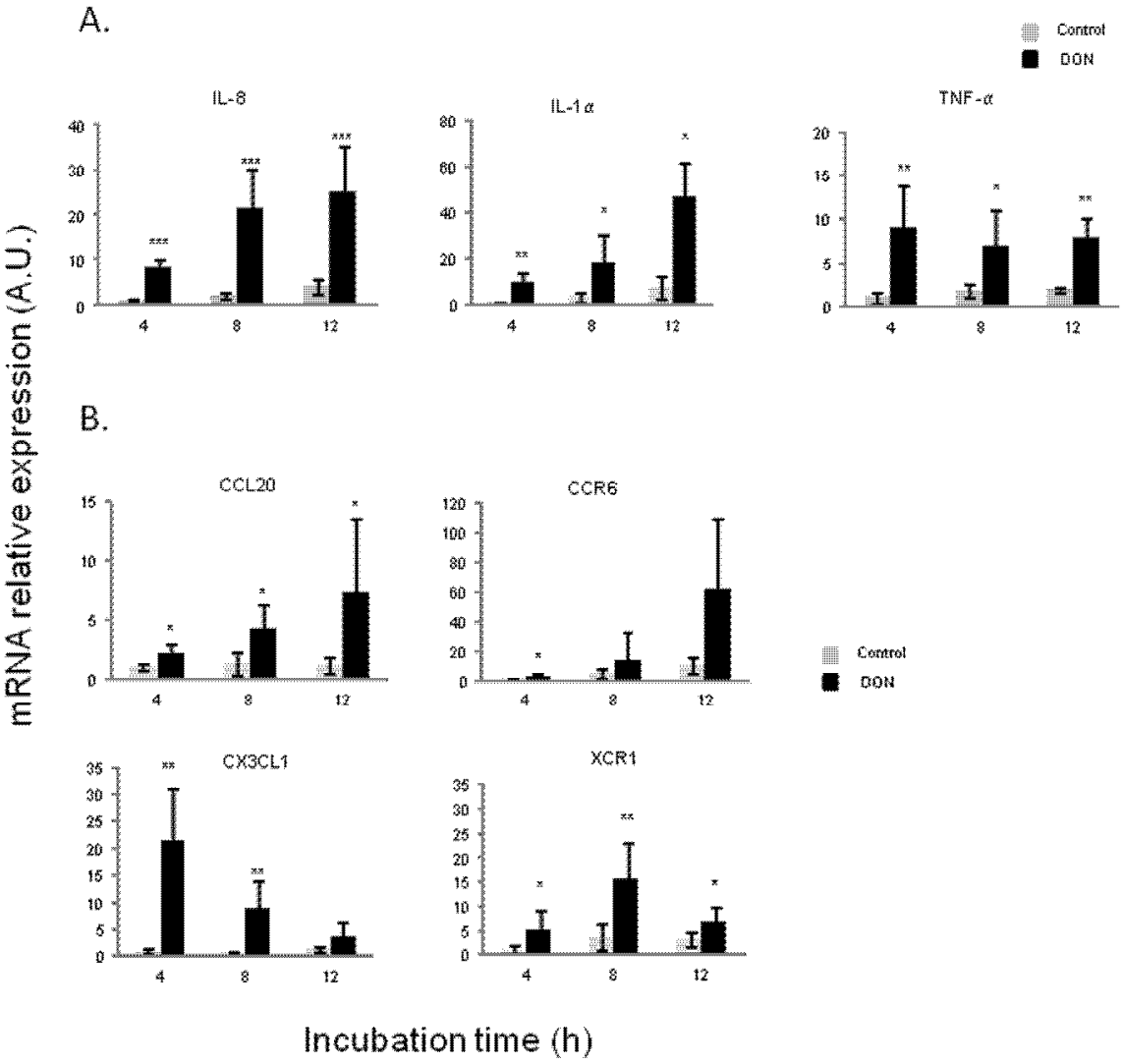


Figure 2. Deoxynivalenol up-regulated pro-inflammatory cytokines (A) and DCs-recruiting chemokines mRNA relative expression (B) in jejunal explants.
doi:10.1371/journal.pone.0053647.g002

expressing DCs and macrophages to sites of tissue damage, driving preferentially the differentiation of naive T-cells towards Th1 or Th17 (Fig.ô 2B). The exposure of jejunal explants to DON significantly increased the expression of CCL20 and CCR6 with a peak after 12 h of exposure (7 and 12 fold induction, respectively). Secondly, we analyzed the expression of CX3CL1 which is known to inhibit Th1 and Th17 differentiation. Opposite to CCL20 and CCR6, CX3CL1 exhibited a maximum peak at 4 h (22 fold induction) and decreased progressively after 8 h and 12 h of DON exposure. XCR1, which is also implicated in DC recruitment, was significantly induced by DON at all exposure times but its maximum level was reached at 8 h of DON exposure (7 fold increase). The expression of both CX3CL1 and XCR1 decreased after their maximal induction peak (after 4 h and 8 h respectively) and this tendency was maintained in the loops experiment after 24 h of exposure (Fig. S1).

Explants were exposed or not with 10 µM of DON for 4 h, 8 h or 12 h. Gene expressions were evaluated by RT-qPCR and normalized with two reference genes (Cyclophilin A and RPL32). Data are presented as means +/− SEM of values obtained with intestinal explants from six different piglets and expressed relative to the control group at 4 h. Asterisks denote significant differences between untreated (gray bars) and DON-treated explants (black bars): * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

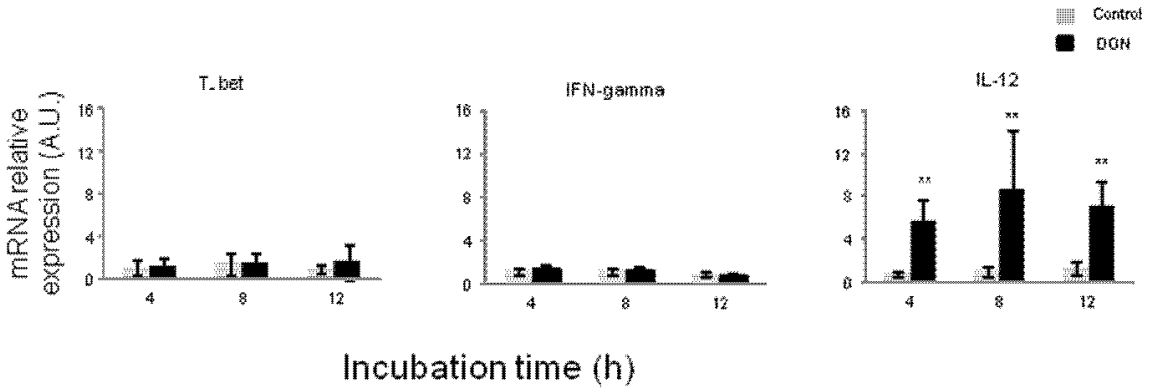


Figure 3. Deoxynivalenol increased IL-12 but not IFN-γ gene expression in jejunal explants.
doi:10.1371/journal.pone.0053647.g003

DON Triggered Th17 Signature genes in Porcine jejunal Explants

In order to examine the effects of DON on naive Th cells differentiation, we analyzed mRNA expression levels of transcription factors and cytokine genes related to Th1 cells (Fig.ô 3), Th17 cells (Fig.ô 4) and Treg cells (Fig.ô 5). DON treatment did not affect expression of T-bet transcription factor nor IFN-γ mRNA levels (Fig.ô 3). Significant increase of IL-12 expression levels was observed at all exposure times (between 6 and 8 fold induction) (Fig.ô 3). DON treatment also induced a time-dependent increase of expression of mRNA encoding for IL-17 A, IL-6 and STAT3 (Fig.ô 4A). Accordingly the protein expression of IL-17A was significantly increased after 12 h of exposure to DON (Fig.ô 4B). IL-1β expression levels were also significantly up-regulated but its levels did not did not vary much in a time dependent manner (16 to 12 fold induction) (Fig.ô 4A). Surprisingly, RORγ-like, an important Th17 transcription factor was negatively regulated by DON treatment (Fig.ô 4A). A different expression profile was observed in genes related to Treg cells. FoxP3 and RALDH1 were not affected by DON treatment after 4 h and 8 h of culture and they were down regulated after 12 h of toxin exposure (Fig.ô 5A). This decrease of Treg cells was also found when analyzing the effect of DON on $CD4^+$ $CD25^+$ $FoxP3^+$ leukocytes extracted from the intestinal lamina propria (Fig.ô 5B). 10 µM of DON significantly reduced the $CD4^+$ $CD25^+$ $FoxP3^+$ cell population of 40%. On the contrary, the preliminary *in vivo* results using the loops experiment suggest an increase of expression of Treg cells related genes (Fig. S1).

Relative mRNA expression of transcription factors and cytokines related to Th1 cells were assessed by RT-qPCR. Explants were exposed or not with 10 µM of DON for 4 h, 8 h or 12 h. Values were normalized with two reference genes (Cyclophilin A and RPL32). Data are presented as means +/− SEM of values obtained with intestinal explants from six different piglets and expressed relative to the control group at 4 h. Asterisks denote significant differences between untreated (gray bars) and DON-treated explants (black bars): * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

Relative mRNA expression of transcription factors and cytokines related to Th17 cells (A) and IL-17 A protein concentration (B) were assessed by RT-qPCR and ELISA. Explants were exposed or not with 10 µM of DON for 4 h, 8 h or 12 h. Values were normalized with two reference genes (Cyclophilin A and RPL32). Data are presented as means +/− SEM of values obtained with intestinal explants from six different piglets and expressed relative to the control group at 4 h. Asterisks denote significant differences between untreated (gray bars) and DON-treated explants (black bars): * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

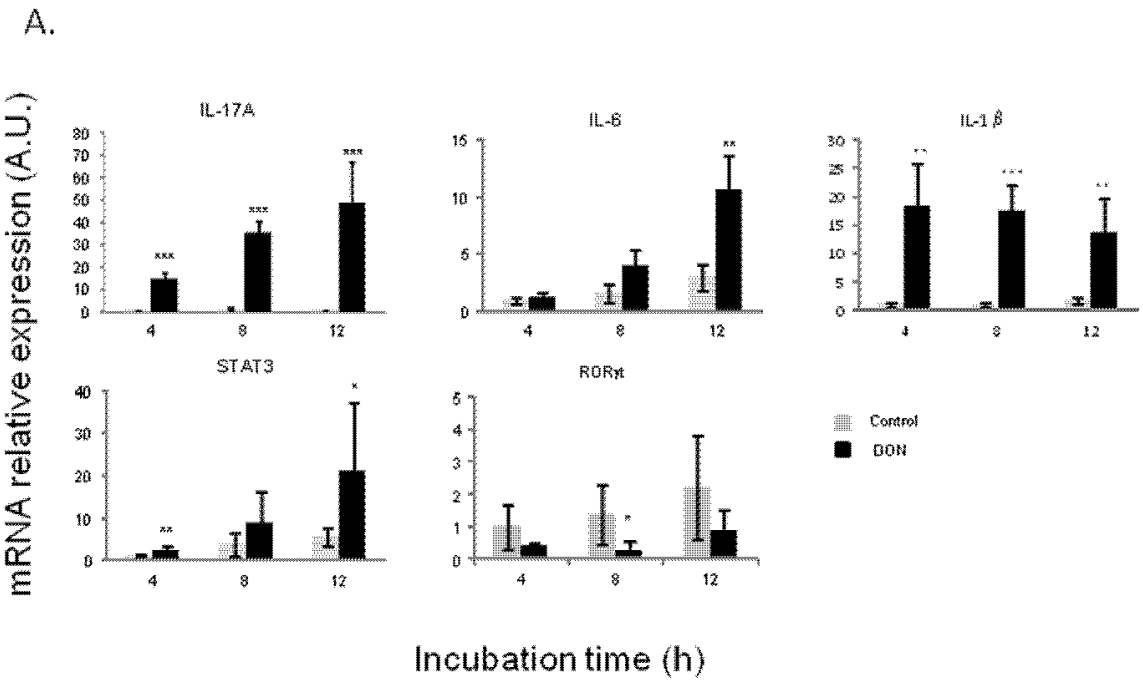
(A) Relative mRNA expression of transcription factors related to T reg cells were assessed by RT-qPCR. Explants were exposed or not with 10 µM of DON for 4 h, 8 h or 12 h. Values were normalized with two reference genes (Cyclophilin A and RPL32). Data are presented as means +/− SEM of values obtained with intestinal explants from six different piglets and expressed relative to the control group at 4 h. (B) The frequency of $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg cells were evaluated by flow cytometry after 2 days of co-culture with different concentration of DON (0.1 to 10 µM). Graphs show the mean ± SEM from duplicates from immune cells of jejunal lamina propria isolated 2 different pigs. Data were calculated as relative percentage to control without toxin. Asterisks denote significant differences between untreated (gray bars) and DON-treated explants (black bars): * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

DON Triggered Pathogenic Th17 Cells Subset in Detriment of Regulatory Th17 (rTh17) Cells in Porcine jejunal Explants

To understand which subset of Th17 cells is preferentially induced by DON, pathogenic Th17-related genes (IL-23 A, IL-22 and IL-21) and rTh17-related genes (TGF-β and IL-10) were analyzed (Fig.ô 6). DON significantly increased IL-23A mRNA expression in a time-dependent manner (3, 17 and 31 fold induction at 4, 8 and 12 hours respectively) (Fig.ô 6A). mRNA expression levels of both IL-22 and IL-21 were also significantly induced but to a lesser extent (maximum levels of 10 and 3.5 fold induction respectively) (Fig.ô 6A). Interestingly, upregulation of these genes did not show after 24 h of DON exposure (Fig. S1). On the contrary, TGF-β mRNA expression was not induced by DON treatment (Fig.ô 6B). Interestingly, IL-10 which is produced by both rTh17 and Treg cells showed a significant induction in the presence of DON (6 fold increase) (Fig.ô 6B).

Discussion

Mycotoxins have become an issue of major concern given their global and frequent occurrence as well as their known toxic effects. Among all, DON is of particular interest because it is one of the most prevalent mycotoxins in Europe and North America. The intestinal tract represents the first barrier against DON-contam-



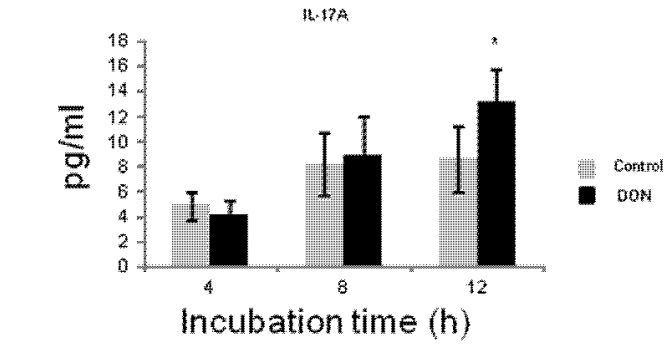


Figure 4. Deoxynivalenol triggered Th17 response in jejunal explants.
doi:10.1371/journal.pone.0053647.g004

inated food and feed. Many authors have already reported Th17 cells to be critical for protection against microbial infections like bacteria, virus and fungi at mucosal surfaces [36,37,38]. The aim of our work was to assess the impact of DON exposure onto the intestinal homeostasis controlled by pro-inflammatory Th17 and the regulatory Treg response. To the best of our knowledge this is the first study showing that DON disrupts the intestinal homeostasis and promotes the Th17 response over the Th1 and T regulatory responses.

Intestinal epithelial cells and jejunal explants were used to investigate the modulation of the intestinal immune response by DON. The choice of using 10 μM of DON was based mainly on the US Federal Grain Inspection Service and the European Union surveys [6,39,40] which evaluated the naturally occurring concentration of this mycotoxin to range between 19 and 50 mg/kg in grain cereals. Assuming that DON would be ingested in one meal, diluted in 1 L of gastrointestinal fluid and would be totally bioaccessible, 10 μM correspond approximately to 3 mg/kg [39,40]. In addition to that, a previous study of our group

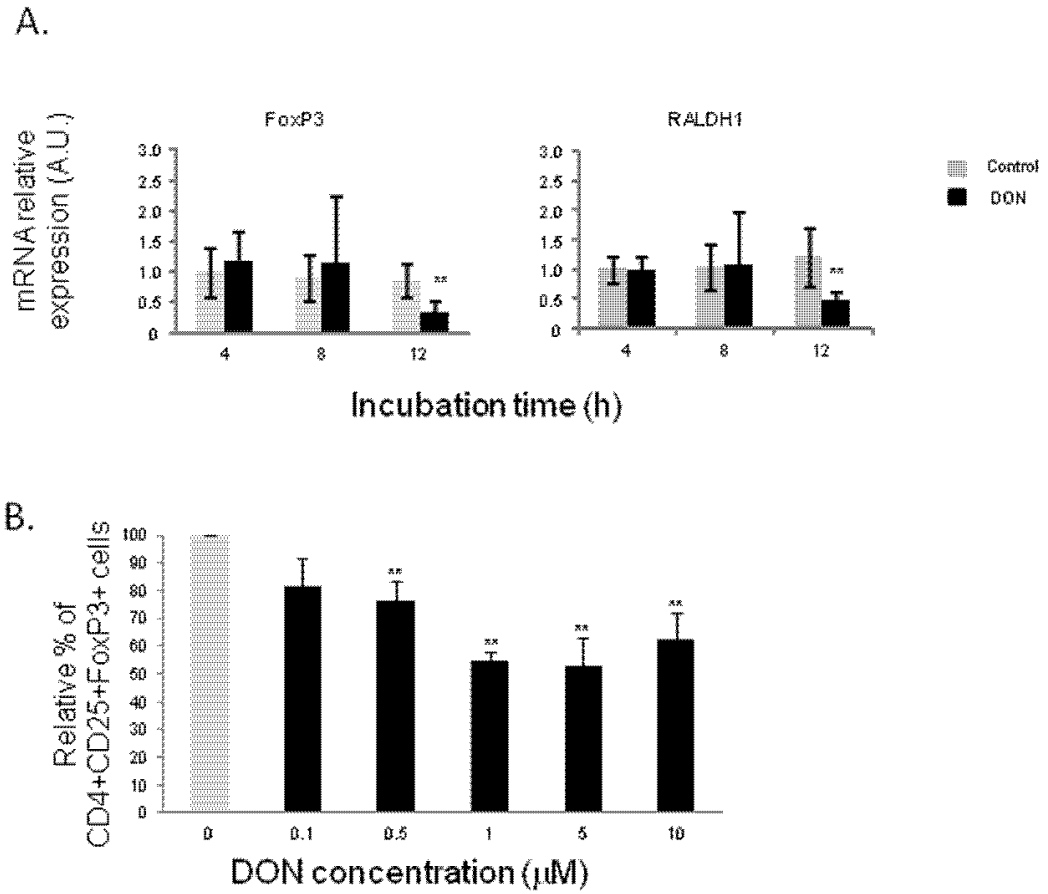


Figure 5. Deoxynivalenol decreased T regulatory response in jejunal explants.
doi:10.1371/journal.pone.0053647.g005

showed that this concentration does not affect cell viability up to 48 h after treatment in the porcine intestinal cell line, IPEC-1 [17] but it does affect the morphology of the epithelial barrier according to another study [27].

In the present experiment, *in vitro* and *ex vivo* exposure to DON led to an early general state of inflammation depicted by mRNA expression increase of IL-8, IL-1α and TNF- α, which is in agreement with previous results of similar studies [41,42]. The inflammation generated at the epithelial level could elicit the activation of the population of Th17 cells by triggering further communication with immune cells of the *lamina propria*. The mode of action by which DON induces such inflammatory response has been described by several authors and it was not the purpose of the present study. Indeed, it has already largely been demonstrated that DON activates ERK1/2 and p38 thus triggering MAPK signaling cascades which upregulate COX-2 and PGE-2, major inductors of the inflammatory response [11]. This molecular mechanism most likely occurs in all immune cellular types, including IECs. Therefore we can also soundly hypothesize that DON-induced MAPK activation in IECs induces chemokine secretion which then stimulates intestinal DCs, thus initiating the classical immune response cascade and lymphocyte activation.

In this study, the exposure to DON induced IL-6, IL-23 and IL-1β expression but did not affect the expression of TGF-β and strongly repressed FoxP3 and RALDH1. These data suggest that in our model DON mainly drives the intestinal immune system towards a Th17 response. In agreement with that, DON strongly induced IL-17 A which is the signature cytokine of these T helper cells, but which can also be produced by other immune cells. However to our knowledge, there is no available antibody for of porcine IL-17 A intracellular labeling which would allow to clarify the source of this cytokine. Despite that, the fact that STAT3, a transcription factor expressed by Th17 cells, was also upregulated in the intestinal explants is a strong indication of the increase of this population in the intestinal tissues. Nevertheless, ROR-γt like, which has been described as the other major transcription factor governing Th17 differentiation in mice [23,43], was not induced but repressed by the presence of DON in explants model. Although this result is surprising, it could be possible that, unlike in the mouse model, in the porcine specie the transcription factor STAT3 plays a more important role than ROR-γt in Th17 differentiation. It would be very interesting to further investigate this point.

The two lineages, Th17 and Tregs share a co-evolutionary origin [44,45] which could explain why they share similarities at

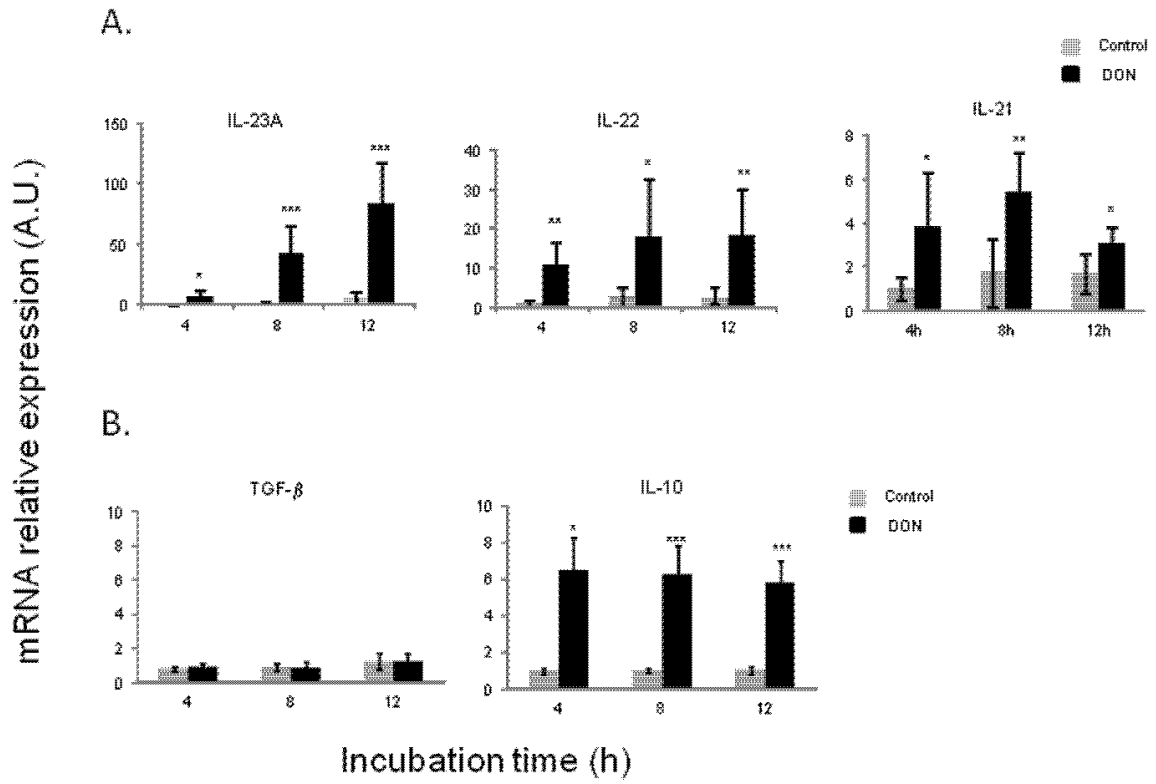


Figure 6. Deoxynivalenol triggered pathogenic Th17 cells subset but not regulatory Th17 (rTh17) cells in porcine jejunal explants.
doi:10.1371/journal.pone.0053647.g006

many levels [46,47,48,49]. In this way, CCR6 appears to be the only chemokine receptor essentially implicated in driving Th17 migration *in vivo* but it is also highly expressed by Tregs [50]. CCL20, the ligand of this receptor drives the conversion of the pathogenic Th17 into the regulatory subsets [23,51]. Our results showed that CCR6 and CCL20 were induced by DON in a time-dependent manner in the intestinal explants. It is therefore tempting to speculate that along the overall pro-inflammatory response both in the intestinal epithelial cells and the intestinal explants, there is a regulatory rTh17 response setting up-rather than the Treg response.

Plasticity of T cells is also reflected in the similarities between rTh17 and Treg cells. Besides their common regulatory action, these two populations share the importance of TGF-β and IL-10 [23,24,51]. TGF-β is involved in the differentiation of these two populations. In this study, there was no significant effect of DON on the expression of this cytokine in the intestinal explants. TGF-β was however secreted by the intestinal epithelial cells after 8, 12 and 24 h of exposure to DON. Further studies will be important to understand the exact role of TGF-β in the differentiation of Tregs in swine but also the impact of DON on the intestinal secretion of this cytokine. However, previous studies have also showed that TGF-β presents minor or absent changes after PMA/Ionomycin or CD3 stimulation [52,53] which might be an indication of the fact that TGF-β might be of less importance in the regulatory response compared to humans and mice. IL-10 is produced by both Tregs and rTh17 to regulate inflammation and has the ability of reversing the pathogenic phenotype of Th17 into rTh17 [24]. In this study, this cytokine was up-regulated in a time independent manner by the presence of DON on explants, which is in contradiction with the absence of increase of FoxP3 and TGF-β. However it is well described that many cells of the innate and adaptive immune system other than Tregs and rTh17 cells express IL-10, such as DCs, macrophages, Th1, Th2 and B cells [54]. Given our results in the intestinal explants on Th1 and Treg, it is most likely for IL-10 to be produced by DCs, macrophages or B cells in that experiment

Taken together, all these results suggest that DON preferentially induces a pro-inflammatory response directed by pathogenic Th17, when CCR6, CCL20 and IL-10 results point to a concomitant protective response most likely lead by rTh17. Supplementary *in vivo* data seems to indicate an increase in the protective response after 24 h of exposure.

Determining whether immune activation or suppression should occur in response to a given pathogen is a critical decision to be taken by the adaptive immune system. Indeed, there is a fine line between inflammation and pathogen elimination and excessive inflammation and tissue damage. Numerous diseases such as rheumatoid arthritis and multiple sclerosis arise from a failure to restore the state of equilibrium [55]. In the intestine, inflammatory bowel diseases (IBD) like ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) are triggered by excessive inflammation of the colon and/or the small bowel leading to recurrent diarrhea and pain [56]. Until recently only excessive Th1 and Th2 responses were accounted for these diseases. Nevertheless, the discovery of the Th17 subset gave a new insight on the causes of these disorders as

IL-17 producing cells were shown to be of major importance in IBD [57]. Besides IL-17, IL-21, IL-22 and IL-23 have also been reported to play an important role in the onset of these diseases [57,58]. Interestingly, all of these cytokines were up-regulated by the presence of DON in our experiments which could imply that chronic exposure to this toxin could be a triggering or enhancing factor of IBD. This hypothesis is supported by a recent study [26] which draws a strong parallel between the alterations caused by exposure to several mycotoxins including DON and the symptoms observed during IBD. In addition to the induction of the above-mentioned cytokines, intestinal permeability is also related to both DON exposure and IBD. This mycotoxin specifically targets claudin expression [16,17] which directly leads to an increase of permeability of the intestinal barrier which could result in increased bacterial translocation, one of the main causes of IBD [56]. The same applies for toll-like receptors (TLRs) impairment, associated with DON exposure [59]. Over activation of dendritic cells (DCs) drawn by abnormal TLR activity could lead to inability to detect bacterial components which is another major source of IBD. Notably, TLR activation disruption has been detected after exposure to T-2 toxin, another member of the trichothecene family [60].

As depicted above, bacterial interactions with the immune cells of the *lamina propria* are a central component of IBD, since inflammation might arise from lack of tolerance to antigens present in commensal bacteria [61]. Besides, loss of the transcription factor T-bet, which regulates TNF-α production, influences bacterial homeostasis by favoring colitogenic microbial populations. The resulting increase of TNF-α production by DCs could trigger breakdown of the intestinal epithelium and facilitate bacterial translocation to the *lamina propria*, increasing risks of IBD [62]. It has already been demonstrated that DON alters the intestinal microbiota of pigs [63]. It thus comes as no surprise that in this study, exposure to DON could possibly lead to induction of colitogenic populations and to strong impairment of the epithelial barrier by the lack of effect on T-bet and significant increase of the expression levels of TNF-α. It is noteworthy that colonization of the small intestine by segmented filamentous bacteria (SFB) of the intestinal microbiota is directly associated with the appearance of Th17 cells and that SFB promote the expression of inflammatory genes linked to IBD [64].

In conclusion, exposure to the mycotoxin DON clearly induced an early intestinal inflammatory response resulting from the interplay of different intestinal cell types and leading to the activation of Th17 cells. These results together with previous observations strengthen the idea that chronical exposure to deoxynivalenol could impair intestinal homeostasis and trigger the appearance of IBD. However, the molecular mechanisms by which this toxin specifically activates Th17 remain unclear. Further research should therefore address the link between MAP kinases activation by DON [11,12] and the herein presented effects on lymphocyte populations. In addition to that, the cellular interplay that takes play among immune cells (IECs DCs T cells) upon DON exposure should be better characterized by analyzing for instance cellular migration of DCs, macrophages and T lymphocytes. Finally, more insight should be gained on the role of commensal and pathogenic bacteria on modulating the Th17 response and the impact of DON on such modulation.

Supporting Information

Figure S1 Fold mRNA expression increase of cytokines and transcription factors after DON exposure in an *in vivo* model of jejunal loops. Following the guidelines provided by the French Council for Animal Care (permit number 2011 07 1) and previous published protocols [65,66,67], loops were performed in a 5 week-old pig. Very briefly, 6 consecutive loops (10- 0 cm long) were made by surgical ligation in a 2 4 m long segment of the jejunum which was previously thoroughly washed with a solution of metrodinazole, a common antibiotic. PBS was injected in 3 loops as negative control and 10 µM of DON were injected in 3 other loops. The pig was euthanized by barbiturate overdose 24 h post surgery. Jejunal tissues were then collected and snap-frozen in liquid nitrogen before RNA extraction. Relative mRNA expression levels of immune genes related to pro-inflammatory cytokines (A), DC-recrutment chemokines (B), Th1 (C), Th17 (D) and Treg (E) signature and pathogenic/regulatory Th17 cytokines (F) were assessed by RT-qPCR. Gene expressions were normalized by the mean of two reference genes (Cyclophilin A and RPL32). Data are presented as mean +/− SEM of values obtained with three different loops and expressed relative to the control group. Significant differences between untreated loops (gray bars) and treated loops (black bars) with 10 µM of DON are marked with asterisks (* $P<0.05$).
(TIF)

Acknowledgments

The authors are also grateful to Philippe Pinton, Anne-Marie Cossalter, Sophie Ausset and Claire Loiseau for their excellent technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LGP IPO. Performed the experiments: PMC JS JC RA. Analyzed the data: PMC JS FM JC RA. Contributed reagents/materials/analysis tools: JC. Wrote the paper: PMC JS.

References

1. Doll S, Danicke S (2011) The *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. Prev Vet Med 102: 132 145.
2. Bryden WL (2007) Mycotoxins in the food chain: human health implications. Asia Pacô Jô Clin Nutr 16 Suppl 1: 95 101.
3. Oswald IP, CC (1998) Immunotoxicity of mycotoxins. Revue Med Vet 149: 585 590.
4. Oswald IP, Marin DE, Bouhet S, Pinton P, Taranu I, et al. (2005) Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. Food Addit Contam 22: 354 360.
5. CAST (2003) Mycotoxins: riks in plant, animal and human systems. Council Agr Sc Technol Task Force Rep. 138: 136 142.
6. SCOOP (2003) Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. Directorate-General Health and Cosummer Protection.
7. Pestka JJ, AT S (2005) Deoxynivalenol: Toxicology and Potential effects on Humans. Jô Toxicol Environ Health 8: 39 69.
8. Rotter BA, Prelusky DB, JJ P (1996) Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). Jô Toxicol Environ Health 48: 1 34.
9. Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, Saif L, Gerdts V (2011) The pig: a model for human infectious diseases. Trends in Microbiology 20: 50 57.
10. Patterson JK, Lei XG, Miller DD (2008) The Pig as an Experimental Model for Elucidating the Mechanisms Governing Dietary Influence on Mineral Absorption. Exp Biol Med 233: 651 664.
11. Pestka JJ, Zhou H-R, Moon Y, Chung YJ (2004) Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. Toxicology Letters 153: 61 73.
12. Zhou HR, Islam Z, Pestka JJ (2003) Rapid, sequential activation of mitogen-activated protein kinases and transcription factors precedes proinflammatory cytokine mRNA expression in spleens of mice exposed to the trichothecene vomitoxin. Toxicol Sci 72: 130 142.
13. Avantaggiato G, Havenaar R, Visconti A (2004) Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an in vitro gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. Food Chem Toxicol 42: 817 824.
14. Bracarense A-PFL, Lucioli J, Grenier B, Drociunas Pacheco G, Moll W-D, et al. (2012) Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in

interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. Brô Jô Nutr: 107: 1776 1786.
15. Maresca M, Mahfoud R, Garmy N, Fantini J (2002) The Mycotoxin Deoxynivalenol Affects Nutrient Absorption in Human Intestinal Epithelial Cells. Jô Nutr 132: 2723 2731.
16. Pinton P, Braicu C, Nougayrede JP, Laffitte J, Taranu I, et al. (2010) Deoxynivalenol impairs porcine intestinal barrier function and decreases the protein expression of claudin-4 through a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. Jô Nutr 140: 1956 1962.
17. Pinton P, Nougayrède J-P, Del Rio J-C, Moreno C, Marin DE, et al. (2009) The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. Toxicol Appl Pharmacol 237: 41 48.
18. Pinton P, Tsybulskyy D, Lucioli J, Laffitte J, Callu P, et al. (2012) Toxicity of deoxynivalenol and its acetylated derivatives on the intestine: differential effects on morphology, barrier function, tight junctions proteins and MAPKinases. Toxicol Sci 130: 180 190.
19. Diesing A-K, Nossol C, Dänicke S, Walk N, Post A, et al. (2011) Vulnerability of Polarised Intestinal Porcine Epithelial Cells to Mycotoxin Deoxynivalenol Depends on the Route of Application. PLoS ONE 6: e17472.
20. Oswald IP (2006) Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine. Veterinary Research 37: 359 368.
21. Coombes JL, Powrie F (2008) Dendritic cells in intestinal immune regulation. Nat Rev Immunol 8: 435 446.
22. Curtis MM, Way SS (2009) Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. Immunology 126: 177 185.
23. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, et al. (2010) Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. Nature 467: 967-U144.
24. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, et al. (2007) TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. Nature Immunol 8: 1390 1397.
25. Zhu J, Paul WE (2009) Heterogeneity and plasticity of T helper cells. Cell Res 20: 4 12.
26. Maresca M, Fantini J (2010) Some food-associated mycotoxins as potential risk factors in humans predisposed to chronic intestinal inflammatory diseases. Toxicon 56: 282 294.
27. Kolf-Clauw M, Castellote J, Joly B, Bourges-Abella N, Raymond-Letron I, et al. (2009) Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: Histopathological analysis. Toxicol in Vitro 23: 1580 1584.
28. Gonzalez-Vallina R, Wang H, Zhan R, Berschneider HM, Lee RM, et al. (1996) Lipoprotein and apolipoprotein secretion by a newborn piglet intestinal cell line (IPEC-1). Amô Jô Physiol 271: G249 259.
29. Zanello G, Berri M, Dupont J, Sizaret P-Y, D'Inca R, et al. (2011) *Saccharomyces cerevisiae* Modulates Immune Gene Expressions and Inhibits ETEC-Mediated ERK1/2 and p38 Signaling Pathways in Intestinal Epithelial Cells. PLoS ONE 6: e18573.
30. Gonzalez-Vallina R, Wang H, Zhan R, Berschneider HM, Lee RM, et al. (1996) Lipoprotein and apolipoprotein secretion by a newborn piglet intestinal cell line (IPEC-1). Amô Jô Physiol 271: G249 G259.
31. Bouhet S, Hourcade E, Loiseau N, Fikry A, Martinez S, et al. (2004) The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. Toxicol Sci 77: 165 171.
32. Meissonnier GM, Pinton P, Laffitte J, Cossalter AM, Gong YY, et al. (2008) Immunotoxicity of aflatoxin B1: impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression. Toxicol Appl Pharmacol 231: 142 149.
33. Bruel T, Guibon R, Melo S, Guillen N, Salmon H, et al. (2010) Epithelial induction of porcine suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) gene expression in response to *Entamoeba histolytica*. Dev Comp Immunol 34: 562 571.
34. Delgado-Ortega M, Melo S, Meurens F (2011) Expression of SOCS1 7 and CIS mRNA in porcine tissues. Vet Immunol Immunopathol 144: 493 498.
35. Haverson K, Singha S, Stokes CR, Bailey M (2000) Professional and non-professional antigen-presenting cells in the porcine small intestine. Immunology 101: 492 500.
36. Zelante T, Bozza S, De Luca A, D'Angelo C, Bonifazi P, et al. (2009) Th17 cells in the setting of *Aspergillus* infection and pathology. Med Mycol 47: S162 S169.
37. Khader SA, Gaffen SL, Kolls JK (2009) Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. Mucosal Immunol 2: 403 411.
38. Kolls JK, Khader SA (2010) The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. uCytokine Growth Factor Rev 21: 443 448.
39. Trucksess MW, Thomas F, Young K, Stack ME, Fulgueras WJ, et al. (1995) Survey of deoxynivalenol in U.S. 1993 wheat and barley crops by enzyme-linked immunosorbent assay. Jô AOAC Int 78: 631 636.
40. Abouzied MM, Azcona JI, Braselton WE, Pestka JJ (1991) Immunochemical assessment of mycotoxins in 1989 grain foods: evidence for deoxynivalenol (vomitoxin) contamination. Appl Environ Microbiol 57: 672 677.
41. Pestka JJ, Amuzie CJ (2008) Tissue distribution and proinflammatory cytokine gene expression following acute oral exposure to deoxynivalenol: comparison of weanling and adult mice. Food Chem Toxicol 46: 2826 2831.
42. Amuzie CJ, Shinozuka J, Pestka JJ (2009) Induction of suppressors of cytokine signaling by the trichothecene deoxynivalenol in the mouse. Toxicol Sci 111: 277 287.
43. Manel N, Unutmaz D, Littman DR (2008) The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. Nat Immunol 9: 641 649.
44. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM (2006) Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. Immunity 24: 677 688.
45. Weaver CT, Hatton RD (2009) Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a co-evolutionary perspective. Nat Rev Immunol 9: 883 889.
46. Kaser T, Gerner W, Saalmuller A (2011) Porcine regulatory T cells: mechanisms and T-cell targets of suppression. Dev Comp Immunol 35: 1166 1172.
47. Kaser T, Gerner W, Mair K, Hammer SE, Patzl M, et al. (2011) Current knowledge on porcine regulatory T cells. Vet Immunol Immunopathol 148: 136 138.
48. Kaser T, Gerner W, Hammer SE, Patzl M, Saalmuller A (2008) Detection of Foxp3 protein expression in porcine T lymphocytes. Vet Immunol Immunopathol 125: 92 101.
49. Kaser T, Gerner W, Hammer SE, Patzl M, Saalmuller A (2008) Phenotypic and functional characterisation of porcine CD4(+)CD25(high) regulatory T cells. Vet Immunol Immunopathol 122: 153 158.
50. Comerford I, Bunting M, Fenix K, Haylock-Jacobs S, Litchfield W, et al. (2010) An immune paradox: how can the same chemokine axis regulate both immune tolerance and activation?: CCR6/CCL20: a chemokine axis balancing immunological tolerance and inflammation in autoimmune disease. Bioessays 32: 1067 1076.
51. Esplugues E, Huber S, Gagliani N, Hauser AE, Town T, et al. (2011) Control of TH17 cells occurs in the small intestine. Nature 475: 514 518.
52. Ledger TN, Pinton P, Bourges D, Roumi P, Salmon H, et al. (2004) Development of a Macroarray To Specifically Analyze Immunological Gene Expression in Swine. Clin Diagn Lab Immunol 11: 691 698.
53. Käser T, Müllebner A, Hartl RT, Essler SE, Saalmüller A, et al. (2012) Porcine T-helper and regulatory T cells exhibit versatile mRNA expression capabilities for cytokines and co-stimulatory molecules. Cytokine 60: 400 409.
54. Paul G, Khare V, Gasche C (2011) Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. Eurô Jô Clin Invest 42: 95 109.
55. Miossec P (2009) Diseases that may benefit from manipulating the Th17 pathway. Eurô Jô Immunol 39: 667 669.
56. Matricon J, Barnich N, Ardid D (2010) Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. Self Nonself 1: 299 309.
57. Caprioli F, Pallone F, Monteleone G (2008) Th17 immune response in IBD: A new pathogenic mechanism. Jô Crohns Colitis 2: 291 295.
58. Ouyang W, Valdez P (2008) IL-22 in mucosal immunity. Mucosal Immunol 1: 335 338.
59. Pestka J, Zhou HR (2006) Toll-like receptor priming sensitizes macrophages to proinflammatory cytokine gene induction by deoxynivalenol and other toxicants. Toxicol Sci 92: 445 455.
60. Seeboth J, Solinhac R, Oswald I, Guzylack-Piriou L (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. Vet Res 43: 35.
61. Chassaing B, Darfeuille-Michaud A (2011) The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. Gastroenterology 140: 1720 1728.
62. Garrett WS, Lord GM, Punit S, Lugo-Villarino G, Mazmanian SK, et al. (2007) Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. Cell 131: 33 45.
63. Waché YJ, Hbabi-Haddioui L, Guzylack-Piriou L, Belkhelfa H, Roques C, et al. (2009) The mycotoxin Deoxynivalenol inhibits the cell surface expression of activation markers in human macrophages. Toxicol 262: 239 244.
64. Ivanov, II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, et al. (2009) Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. Cell 139: 485 498.
65. Gerdts V, Uwiera RRE, Mutwiri GK, Wilson DJ, Bowersock T, et al. (2001) Multiple intestinal "loops" provide an in vivo model to analyse multiple mucosal immune responses. Jô Immunol Methods 256: 19 33.
66. Meurens F, Berri M, Auray G, Melo S, Levast B, et al. (2009) Early immune response following *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar *Typhimurium* infection in porcine jejunal gut loops. Vet Res 40: 05.
67. Vandenbroucke V, Croubels S, Martel A, Verbrugghe E, Goossens J, et al. (2011) The Mycotoxin Deoxynivalenol Potentiates Intestinal Inflammation by *Salmonella Typhimurium* in Porcine Ileal Loops. PLoS ONE 6: e23871.
68. Grenier B, Loureiro-Bracarense AP, Lucioli J, Pacheco GD, Cossalter AM, et al. (2011) Individual and combined effects of subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins in piglets. Mol Nutr Food Res 55: 761 771.
69. Levast B, de Monte M, Chevaleyre C, Melo S, Berri M, et al. (2010) Ultra-early weaning in piglets results in low serum IgA concentration and IL17 mRNA expression. Vet Immunol Immunopathol 137: 261 268.
70. Kiros TG, van Kessel J, Babiuk LA, Gerdts V (2011) Induction, regulation and physiological role of IL-17 secreting helper T-cells isolated from PBMC, thymus, and lung lymphocytes of young pigs. Vet Immunol Immunopathol 144: 448 454.
71. Royaee AR, Husmann RJ, Dawson HD, Calzada-Nova G, Schnitzlein WM, et al. (2004) Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. Vet Immunol Immunopathol 102: 199 216.
72. Saurer L, McCullough KC, Summerfield A (2007) In vitro induction of mucosa-type dendritic cells by all-trans retinoic acid. Jô Immunol 179: 3504 3514.

II. Effets comparés de deux fusariotoxines : le déoxynivalénol (DON) et la toxine T-2 (T-2)

Dans la seconde partie de ce second chapitre, l'étude des effets comparés du DON et de la toxine T-2 sur la réponse immunitaire au niveau du GALT a été entreprise.

Résumé

Le déoxynivalénol (DON) et la toxine T-2 sont deux mycotoxines de la famille des trichothécènes qui contaminent fréquemment les cultures de céréales. Elles sont considérées comme des contaminants naturels des denrées alimentaires entrainant des problèmes de santé publique et de santé animale. L'intestin représente la première cible de ces trichothécènes. Récemment, Cano et al. (2012) ont montré que le DON agit sur la balance immunitaire intestinale en favorisant la différenciation des lymphocytes Th naïfs en Th17 au détriment du développement des lymphocytes T régulateurs (Tregs) entrainant une perturbation de la réponse immunitaire intestinale. Le but de cette présente étude était de comparer l'effet de ces deux trichothécènes sur cet équilibre immunitaire en se focalisant sur les différents acteurs immunitaires qui la régulent et la composent à savoir les cellules épithéliales intestinales (IECs), les cellules dendritiques (DCs) mais également les sous-populations lymphocytaires inflammatoires et régulateurs. Dans ce but, différents modèles *in vitro* (IPEC-1 et cultures primaires de DCs et de PBMCs) et *ex vivo* (explants intestinaux) ont été exposées aux toxines et des analyses transcriptomiques et phénotypiques ont été réalisées respectivement par qPCR et cytométrie en flux. Les résultats de cette étude montrent que l'exposition d'explants intestinaux au DON et à la toxine T-2 induit significativement l'expression des gènes liés à l'inflammation innée ainsi que ceux associés à la voie IL-17. L'analyse phénotypique montre que l'IL-17A induite par les toxines est produit principalement par les cellules Tγδ. Cependant, les mécanismes mis en place et le type de réponse inflammatoire produite semblent spécifiques à chaque toxine. En effet, seule une exposition des IECs au DON agit sur l'expression de CCL20, chémokine impliquée dans le recrutement immunitaire. De plus, seul le DON diminue de façon significative l'expression des gènes liés à la différenciation des Tregs, bien que ces deux mycotoxines aient un impact

sur les sous-populations Tregs $CD4^+$, Tregs $CD8^+$ et les Tregs mémoires. En conclusion, ces deux mycotoxines induisent la production d'IL-17A par les cellules $T\gamma\delta^+IL\text{-}17A^+$ ainsi qu'une action délétère sur l'ensemble des cellules Tregs. Cette étude montre ainsi que ces contaminants alimentaires peuvent être à l'origine ou faire partie des facteurs de persistance aux maladies inflammatoires intestinales (IBD).

Introduction

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par les moisissures qui peuvent contaminer un large éventail de denrées alimentaires destinées à la consommation (Binder E, 2007). De par leurs multiples effets toxiques, la présence de mycotoxines est considérée comme un facteur de risque pour la santé humaine et animale (AFSSA, 2009; CAST, 2003; Wannemacher and Wiener, 1991). Les mycotoxines de la famille des trichothécènes produits par des moisissures du genre *Fusarium*, comprenant notamment le déoxynivalénol (DON) et la toxine T-2 (T-2) sont largement répandues dans les céréales et leurs produits dérivés, en Europe et Amérique du Nord (CAST, 2003). La toxicité de ces deux trichothécènes a été largement documentée aussi bien pour l'Homme que pour différentes espèces animales (AFSSA, 2009; Oswald and Comera, 1998). En raison de son alimentation riche en céréales, le porc représente l'espèce la plus exposée aux mycotoxines (Pestka and Smolinski, 2005). Chez cette espèce, les intoxications associées à l'ingestion de DON ou de T-2 induisent des symptômes comparables tels qu'une salivation importante, des diarrhées, des vomissements ou une inappétence associée à une perte de gain de poids (Pang et al., 1986; Pestka and Smolinski, 2005; Verbrugghe et al., 2012; Wu et al., 2010). Le tractus gastro-intestinal et le système immunitaire du porc étant proche de celui de l'Homme, cette espèce peut être considérée comme un bon modèle d'étude dont les résultats peuvent être extrapolés à la santé humaine.

Le tractus gastro-intestinal est la principale voie d'entrée des contaminants alimentaires tels que les mycotoxines. La première barrière rencontrée par les mycotoxines suite à leur ingestion est constituée par les cellules épithéliales intestinales (IECs). Des études antérieures ont montré que le DON et la toxine T-2 peuvent compromettre l'intégrité et la fonction de cette barrière (Goossens et al., 2012; Pinton et al., 2009). En réponse à ces agressions, les IECs sont capables de produire différentes cytokines pro-inflammatoires (IL-1

alpha, TNF-alpha, IL-6, IL-8) et des chémokines (CCL20 et CX3CL1) qui permettent le recrutement et l'activation des cellules immunitaires présentes dans la *lamina propria* (McDonald et al., 2007; Rimoldi et al., 2005; Sonnenberg et al., 2011). Au sein des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, ces IECs sont également en relation directe avec les cellules dendritiques (DCs), cellules sentinelles de l'organisme impliquées dans la régulation des réponses immunitaires, à la fois contre les agents pathogènes et commensaux. Ces DCs sont capables de présenter les épitopes de ces antigènes via les molécules du CMH classe II (MHCII) pour activer les LT $CD4^+$ naïfs. Ces lymphocytes T $CD4^+$ vont alors subir une expansion clonale localement dans les ganglions lymphatiques et se différencier en différentes sous-populations de cellules effectrices. La différenciation de ces lymphocytes T repose sur l'environnement cytokinique et leur action directe sur les DCs. Par exemple, lors du processus de tolérance orale, les DCs produisent de l'acide rétinoïque (RA) à partir du rétinol (vitamine A), qui permet de promouvoir la différenciation de Tregs ($FoxP3^+$) en périphérie et d'inhiber la différenciation des lymphocytes inflammatoires Th17, une sous-population de lymphocyte T $CD4^+$ sécrétant de l'IL-17. Cependant, bien que de nombreuses études suggèrent que l'IL-17 est produit principalement par les cellules Th17, d'autres sous-populations telles que les cellules lymphoïdes « innées » (Kim and Jordan, 2012; Sutton et al., 2012), les cellules T $CD8^+$, les cellules T NK invariants (iNKT) ainsi que les cellules T$\gamma\delta$ se sont également révélées comme des producteurs majeurs d'IL-17 (Kim and Jordan, 2012). Le dialogue entre ces différents acteurs cellulaires présents au niveau des tissus muqueux permet de moduler la réponse immunitaire afin d'atteindre un état d'homéostasie. Lors de l'ingestion de pathogènes ou de contaminants alimentaires, la rupture de cet état d'équilibre s'avère déterminante dans le développement des maladies inflammatoires de l'intestin (IBD) telles que la maladie de Crohn (Annunziato et al., 2007; Fujino et al., 2003; Pandolfi et al., 2009).

Responsables de nécroses au niveau des tissus hématopoïétiques et des organes lymphoïdes, les trichothécènes sont connus pour être de puissants immunomodulateurs, leurs cibles privilégiées étant les cellules du système immunitaire (AFSSA, 2009; Bailey, 2009; De Nicola et al., 1978; Oswald and Comera, 1998). De faibles doses de DON (3 µM) ou de toxine T-2 (1 à 10 nM) peuvent modifier le phénotype et la maturation des cellules dendritiques (Bimczok et al., 2007; Hymery et al., 2009; Luongo et al., 2010) ainsi que la

capacité des macrophages à s'activer et produire une réponse pro-inflammatoire au contact des agonistes des TLRs (Seeboth et al., 2012). (Pestka et al., 2004). Ces toxines peuvent également entrainer une diminution du nombre de lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ (Nagata et al., 2001) ou diminuer la capacité de prolifération des lymphocytes T stimulés par des mitogènes (Meky et al., 2001).

Récemment, Seeboth et Cano et al. (2013) a montré qu'une exposition d'explants intestinaux porcins au DON (10 µM) module la balance immunitaire intestinale en faveur d'une réponse inflammatoire Th17 en inhibant la mise en place de la réponse T régulatrice (Seeboth et al., 2013), sans aborder les mécanismes mis en jeu. Il existe peu de données sur les effets comparés de toxines appartenant à une même famille sur la réponse immunitaire locale. La présente étude a donc pour objectif d'étudier les mécanismes d'action d'une exposition au DON en comparaison à la toxine T-2 sur la balance immunitaire intestinale en se focalisant sur la modulation de l'expression cytokinique et phénotypique des différents acteurs immunitaires présents au niveau intestinal.

Matériels et méthodes

Produits chimiques

Les solutions mères de DON et de toxine T-2 purifiées (Sigma-Aldrich, Ayshire, UK) sont reprises dans du dimethylsulfoxide (DMSO) et sont conservés à -20°C avant d'être diluées dans du milieu de culture. Les échantillons contrôles sont traités avec des concentrations équivalentes de DMSO.

Traitement des cultures primaires et des cellules de lignées intestinales par le DON et la T-2

Traitement des explants jéjunaux

Dans le respect des règles du comité d'éthique concernant les procédures engageant les animaux de laboratoire, des porcelets âgés de 4 à 5 semaines (n=6) sont utilisés pour la réalisation des explants à partir de tissu jéjunal d'après la procédure préalablement décrite par Seeboth et Cano et al. (2012) (Seeboth et al., 2013) (n° de saisine : TOXCOM/0017/IO PP). Des segments de jéjunum de 5 cm sont collectés dans du milieu de Williams pré-chauffé (Sigma-Aldrich) supplémenté de 200 U/mL de pénicilline et 200 µg/mL de streptomycine

(Eurobio, Courtaboeuf, France). Après avoir retirée la musculeuse externe, le jéjunum est ouvert longitudinalement et rincé avec du PBS supplémenté avec 10% de SVF. Les explants jéjunaux sont réalisés à l'aide d'un trocart à dissection (Centravet, Lapalisse, France) et sont placés dans du milieu de Williams contenant 1% de pénicilline/streptomycine, 0,5% de gentamycine (Eurobio), 4,5 g/L de glucose (Sigma-Aldrich), 10% de SVF (Eurobio) et 30 mM d'acides aminés (Ala/Glu) (Eurobio). Afin d'évaluer l'effet du DON et de la toxine T-2 sur l'homéostasie intestinale, une concentration non toxique pour chacune d'elle sur ce modèle a été déterminé dans des études précédentes (Kolf-Clauw et al., 2009; Kolf-Clauw et al., 2013; Pinton et al., 2009). Le choix d'une concentration de 10 µM de DON est basé sur des études antérieures, lesquelles ont évaluées une concentration en DON naturellement présente dans les grains, comprise entre 19 et 50 mg/kg d'aliment. En considérant que le DON serait ingéré en une seule ingestion, dilué dans 1L de liquide gastro-intestinal et serait totalement bioaccessible, une dose de 10 µM correspondrait approximativement à 0,3 mg/kg de poids corporel/jour (Abouzied et al., 1991; Trucksess et al., 1995). De plus, nos précédentes études ont montré que cette concentration n'affectait pas la viabilité cellulaire des cellules épithéliales intestinales porcines (IPEC-1) après 48h de traitement (Pinton et al., 2009). Le choix d'une concentration de 3 nM de toxine T-2 est basé sur les études précédentes réalisées au sein du laboratoire (Kolf-Clauw et al., 2013; Seeboth et al., 2012). Cette dose de 3 nM de toxine T-2 correspond à une faible dose par rapport à la dose journalière tolérable (TDI) fixée à 100 ng/Kg de poids corporel/ jour (EFSA, 2011). Ainsi, les explants sont incubés pendant 1h en présence de DON (10 µM), de toxine T-2 (3 nM) ou de DMSO pour les échantillons contrôles. Suite à cette incubation, ces explants sont rincés et remplacés par du milieu de culture exempt de toxines pendant 3 heures à 39°C. Les tissus sont récupérés pour une analyse transcriptomique.

Traitement des cellules IPEC-1

La lignée cellulaire IPEC-1 est une lignée porcine de cellules épithéliales intestinales provenant du petit intestin d'un porcelet non sevré (Gonzalez-Vallina et al., 1996). Les cellules IPEC-1 sont cultivées comme décrit précédemment (Bouhet et al., 2004). En résumé, les cellules sont placées sur des membranes de 4,2 cm2 de polyéthylène téréphtalate comprenant des pores d'une taille de 0,4 µm (Beckon Dickinson, Pont de Claix, France) à une

concentration cellulaire de $2x10^5$ cellules par puits dans 1 ml de milieu de prolifération : DMEM F12-HAM (Sigma) supplémenté en L-glu 1% (Eurobio), ITS (8,4 µg/ml d'insuline de pancréas de bovin, 7,6 µg/ml de transferrine, 10 ng/ml de sélénium) (Sigma), penicilline/streptamycine 1%, SVF 5% et EGF (5 ng/ml) (BD Biosciences, Bedford, USA) puis différenciées pendant 10 jours dans du milieu de différenciation (DMEM F12-HAM supplémenté en L-glu 1%, ITS (8,4 µg/ml d'insuline de pancréas de bovin, 7,6 µg/ml de transferrine, 10 ng/ml de sélénium, pénicilline/streptamycine 1%, EGF (5 ng/ml) et dexaméthasone (20 µg/ml) (Sigma). Les traitements sont appliqués au niveau du compartiment apical afin de mimer une exposition *in vivo*. Les concentrations en mycotoxine utilisées sur ce modèle cellulaire ont été déterminées dans des études précédentes (Kolf-Clauw et al., 2013; Pinton et al., 2009). Les IPEC-1 sont incubées pendant 1h en présence de 10 µM de DON, de 3 nM de toxine T-2 ou avec du DMSO (contrôle) à 39°C sous une atmosphère humide et supplémentée de 5% de CO2. A la fin des traitements, les cellules sont récupérées dans le but de réaliser une analyse transcriptomique.

Obtention et traitement des PBMCs

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) sont isolées à partir de sang de porc sur un gradient de ficoll-Paque (1,077 g/l, Amersham Pharmacia biotech, Uppsala, Suède). Les PBMCs sont ajustées à une concentration cellulaire de $2x10^6$ cellules/ml. Les cellules sont stimulées par la concanavaline A (ConA, 2,5 µg/ml) pendant 48h afin de détecter des LT régulateurs selon le protocole décrit par Käser et al. (2008) (Kaser et al., 2008b), ou en présence d'un cocktail contenant 15 nM de phorbol-myristate-acetate (PMA; Sigma), 1 µg/ml d'ionomycine (Sigma), et 10 µg/ml de brefeldine A pendant 5h à 39°C, 5% de CO2, dans le but d'analyser les cellules productrices d'IL-17 par cytométrie en flux selon le protocole décrit par Stepanova et al. (2012) (Stepanova et al., 2012). Les PBMCs sont traités par des concentrations décroissantes de DON (1 ; 0,5 et 0,1 µM) ou de toxine T-2 (3, 1 et 0,3 nM). Un contrôle négatif correspondant à des PBMCs stimulés en absence de toxine est également réalisé lors de chaque expérience. Chacune de ces expérimentations a été réalisée en triplicat.

Obtention et traitement des cellules dendritiques dérivées des monocytes porcins (MoDCs)

Les cellules dendritiques dérivées des monocytes sont préparées comme décrit précédemment par Guzylack-Piriou et al. (2006) (Guzylack-Piriou et al., 2006). En bref, les monocytes issus du sang sont purifiés en utilisant le système de tri magnétique (MACS, Miltenyi biotech GmBH, Bergish Gladblach, Allemagne) des cellules SWC3A positives (clone SWC3A donné gracieusement par le Dr Saalmüller de l'Université vétérinaire de Vienne, Autriche). Les cellules sont lavées par centrifugation et reprises en DMEM high glucose sans rouge de phénol (Sigma) supplémentées de 10% de SVF et de 200 U/mL pénicilline et de 200 µg/mL de streptomycine. Elles sont ajustées à une concentration cellulaire de $1x10^6$ cellules/ml et mises en culture en présence d'IL-4 recombinant porcin (100 U/ml) et de GM-CSF recombinant porcin (150 ng/ml) gracieusement donné par le Dr. Summerfield (IVI, Suisse). La maturation des MoDCs est réalisée en présence d'un cocktail comprenant du LPS (20 µg/ml) (Invivogen, Toulouse, France), du TNF-α (1µg/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) et de l'IFN-alpha porcin recombinant (1000 U/ml) (donné gracieusement par le Dr. Summerfield). Le cocktail de maturation est ajouté en même temps que les mycotoxines. Les MoDCs sont incubés pendant 24h à 39°C sous une atmosphère enrichie à 5% de CO2. La cytotoxicité du DON (de 0 à 100 µM) et de la toxine T-2 (0 à 300 nM) sur les MoDCs immatures et matures ($1x10^5$ cellules/ml) est évaluée à l'aide du kit CelltiterGlo luminescent cells (Promega, Madison, USA). Ce test est basé sur la quantification de l'ATP aboutissant à une réaction luminescente catalysée par la luciférase. Le contrôle négatif sans toxine correspond au témoin 100% de viabilité. Toutes les expériences sont réalisées en triplicat et les IC_{50} sont déterminés par le logiciel SigmaPlot version windows 11.0 (Systat software Inc., Chicago,USA). L'effet du DON et de la toxine T-2 est évalué sur deux marqueurs de maturation des cellules dendritiques, l'expression du MHCII (MSA3, anticorps monoclonal donné gracieusement par A. Saalmüller) et du CD80/86 (détecté en utilisant un anticorp dirigé contre la protéine de fusion Ig-CLTA4 (Alexis corporation, Lausanne, Suisse) (Guzylack-Piriou et al., 2004). Les cellules marquées avec le conjugué sont utilisées pour vérifier la spécificité du marquage. Ces cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux

(MACSQuant analyser, Miltenyi biotech, Paris, France). Le traitement des données est réalisé à l'aide du logiciel VenturiOne (Applied Cytometry, Sheffield, UK).

Extraction d'ARN et analyse qPCR

L'extraction des ARNs totaux issus des explants et des IPEC-1 est réalisée par précipitation au Trizol (Extract all, Eurobio) et à l'isopropanol. La concentration des ARNs est mesurée à l'aide du Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer. La reverse transcription et la qPCR en temps réel sont effectuées comme décrit précédemment par Cano et al. (2012) (Seeboth et al., 2013). Des échantillons d'ARN ont été non rétro-transcrits dans le but de vérifier une éventuelle amplification d'ADN génomique. La spécificité des produits de PCR est évaluée à la fin de la réaction par l'analyse de leurs courbes de dissociation. Les amorces spécifiques des différents gènes (tableau 1) sont achetées chez Invitrogen. L'intensité initiale de fluorescence est déterminée par la méthode des ΔΔCt. Chaque valeur obtenue est normalisée par deux gènes de ménage, la ribosomal protein L32 (RPL32) et la cyclophiline A. Enfin, l'expression relative des gènes est exprimée en fonction des échantillons contrôles correspondant aux échantillons n'ayant reçu ni le traitement DON ni le traitement T-2.

Tableau 1 : Liste des gènes et séquences des amorces sens (F) et anti-sens (R) utilisés pour la qPCR.

Symbole du gène	Nom du gène	Référence de la séquence	Séquences des amorces
Cyclo A	Cyclophiline A	MN_214353	F: CCCACCGTCTTCTTCGACAT R: TCTGCTGTCTTTGGAACTTTGTCT
RPL32	Ribosomal Protein L32	MN_001001636	F: AGTTCATCCGGCACCAGTCA R: GAACCTTCTCCGCACCCTGT
IL1-α	Interleukin 1 - alpha	NC_010445.3	F: TCAGCCGCCCATCCAA R : AGCCCCGGTGCCATGT
IL1-β	Interleukin 1 - beta	NM_001005149	F: GAGCTGAAGGCTCTCCACCTC R: ATCGCTGTCATCTCCTTGCAC
IL-6	Interleukin- 6	NM_214399	F: GGCAAAAGGGAAAGAATCCAG R: CGTTCTGTGACTGCAGCTTATCC
IL-8	Interleukin- 8	NM_213867	F: GCTCTCTGTGAGGCTGCAGTTC R: AAGGTGTGGAATGCGTATTTATGC
IL-10	Interleukin- 10	NM_214041	F: GGCCCAGTGAAGAGTTTCTTTC R: CAACAAGTCGCCCATCTGGT

IL-17A	Interleukin- 17 alpha	AB102693 (Levast et al., 2010)	F: CCAGACGGCCCTCAGATTAC R: CACTTGGCCTCCCAGATCAC
IL-21	Interleukin- 21	MN_214415 (Kiros et al., 2011)	F : GGCACAGTGCCCCATAAATC R: GCAGCAATTCAGGGTCCAAG
IL-22	Interleukin- 22	AY937228 (Levast et al., 2010)	F: AAGCAGGTCCTGAACTTCAC R: CACCCTTAATACGGCATTGG
IL-23A	Interleukin- 23 alpha	(Dawson et al., 2009)	F: GAGAAGAGGGAGATGATGAGACTACA R: GGTGGATCCTTTGCAAGCA
TNF-α	Tumor necrosis factor - alpha	NM_214022	F: ACTGCACTTCGAGGTTATCGG R: GGCGACGGGCTTATCTGA
TGF-β	Transforming growth factor - beta	X54859 (Levast et al., 2010)	F: GAAGCGCATCGAGGCCATTC R: GGCTCCGGTTCGACACTTTC
FoxP3	Forkhead box P3	AY669812 (Meurens et al., 2009)	F: GGTGCAGTCTCTCTGGAACAA R: GGTGCCAGTGGCTACAATAC
RALDH1	Retinoid acid lactase dehydrogenase 1	NC_010460,3 IVI suisse	F: TGGAGTGTGTGGCCAGATCA R: GCAGGCCCTATCTTCCAAATG
CCR6	Chemokine (C-C motif) receptor 6	(Dawson et al., 2009)	F: CCTGCACTGCTGCCTCAA R: TTCAGAAAGTAGCTCCGGAA
CCL20/MIP3 alpha	Chemokine (CC motif) ligand 20	NM_001024589 (Meurens et al., 2009)	F: GCTCCTGGCTGCTTTGATGTC R: CATTGGCGAGCTGCTGTGTG
CX3CL1/ Fractalkine	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	EST CK464144 (Meurens et al., 2009)	F: GCAGCTCCTAGTCCATTAC R: CACCATTCTGACCCAAAG
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin	Dawson probe	F: GCATCAGGGAGACTCCAACCT R: CTTCTCATTCCCAGTGCACATG
IgA	Imunogobulin A (heavy chain)	AB194101 (Levast et al., 2010)	F: ACCGCCACCATCACCAAACC R: AGCCATCGCACCAGCACATC
BAFF	B-cell activating Factor family	NM_001097498 (Meurens et al., 2009)	F: GAGAGCAGCTCCATTCAAAG R: GCA TGC CAC TGT CTG CAA TC

Analyse phénotypique des cellules T régulatrices

L'analyse phénotypique des différentes sous-populations de cellules Tregs obtenues à partir de PBMCs activés est déterminée par la co-expression des marqueurs de surface CD25, CD4

et/ou CD8 associé au marquage intracellulaire du facteur de transcription FoxP3. Dans ce but, les cellules sont premièrement incubées avec l'anti-CD25 porcin (MCA1736 clone K231.3B2, AbDSerotec), l'anti-CD4 porcin (clone 74-12-4, VMRD, USA) et/ou anti-CD8 porcin (clone 76-2-11, VMRD). La réactivité des anticorps est révélée grâce aux anticorps secondaires anti-isotypes suivant : l'Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG1 (Invitrogen), APC goat anti-mouse IgG2b (southern biotech, Birmingham, USA) et le PE-Cy7 goat anti-mouse IgG2a (southern biotech). Pour le marquage intracellulaire, les cellules sont fixées puis perméabilisées avec le kit Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience) suivies par le marquage avec l'anticorps anti-FoxP3-PE (clone FJK-16s ; 0,03 mg d'eBioscience) ou avec le contrôle isotypique IgG2a couplé au PE (0,03 µg) (clone eBR2a, eBioscience). Les différentes sous-populations de Tregs sont analysées par cytométrie en flux (MACSQuant analyser, Miltenyi biotech, Paris, France). Les données obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel VenturiOne (Applied Cytometry, Sheffield, UK). Une analyse de la co-expression des différents marqueurs CD4/CD8/CD25 et FoxP3 permet de déterminer le pourcentage de cellules $CD4^+CD8^-CD25^+FoxP3^+$ ($CD4^+$Tregs), $CD4^+CD8^+CD25^+FoxP3^+$ (Tregs mémoires) et $CD4^-CD8^+CD25^+FoxP3^+$ ($CD8^+$Tregs).

Analyse phénotypique des cellules productrices d'IL-17

Après stimulation et traitement par les toxines, les PBMCs porcins sont marqués avec l'anti-TCR-gamma/delta porcin (clone PGBL22, IgG1, Washingthon State University, USA) et l'anti-CD4 porcin (clone 74-12-4, IgG2b, VMRD). La réactivité des anticorps est révélée grâce aux anticorps secondaires anti-isotypes suivant : l'Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG1 (Invitrogen) et l'APC goat anti-mouse IgG2b (southern biotech). Après fixation et perméabilisation de cellules à l'aide du kit Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience), les cellules sont marquées par un anti-IL17A-PE (clone SCPL1362, CliniScience, Nanterre, France) (Stepanova et al., 2012). Le pourcentage de cellules $TCR\gamma\delta^+IL\text{-}17^+$ et $CD4^+IL\text{-}17^+$ est évalué par cytométrie en flux à l'aide du MACSQuant analyser (Miltenyi biotech). Le traitement des données est réalisé à l'aide du logiciel VenturiOne (Applied Cytometry, Sheffield, UK).

Statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 4. Les résultats sont exprimés par la moyenne +/- SEM. La comparaison entre les groupes est effectuée à

l'aide d'un test non paramétrique (Test de Mann Withney). Les différences sont considérées comme statistiquement significatives lorsque la p-value est inférieure à 0,05.

Résultats

La toxine T-2, de façon similaire au DON, induit un état inflammatoire sur les explants intestinaux, mais seul le DON altère significativement la voie T régulatrice.

En se basant sur nos résultats précédents montrant une potentialisation de l'expression de gènes de l'immunité inflammatoire par le DON dans un modèle d'explants jéjunaux (Seeboth et al., 2013), ce même modèle cellulaire *ex vivo* a été utilisé pour comparer les effets de deux toxines de la famille des trichothécènes : le DON et la toxine T-2. Le niveau d'expression du gène pro-inflammatoire IL-1α est augmenté de façon similaire en présence de DON (1,84 +/-0,23) et en présence de T-2 (2,18 +/- 0,10), expression significative par rapport au contrôle. En revanche, le DON induit une augmentation significative de l'expression du gène de l'IL-8 (5,6 fois plus par rapport au contrôle) mais pas du gène du TNF-α. Inversement, la toxine T-2 induit une expression significative du gène du TNF-α (5,5 fois plus par rapport au contrôle) mais ne semble pas impacter l'expression du gène de l'IL-8 (figure 1A). Concernant les gènes impliqués dans la réponse Th1/Th2 (figure 1B), le DON comme la toxine T-2 induisent une augmentation de l'expression du gène IL-10 respectivement de 3,45 et de 5,6 fois par rapport au contrôle. De plus, le DON induit significativement l'expression de l'IL-12 (3,10 +/- 0,49) alors que la toxine T-2 induit significativement l'expression de l'IFN-gamma (IFN-γ) (2,04 +/- 0,35). Ces résultats indiquent que le DON et la toxine T-2 induisent partiellement une réponse Th1, le DON agirait sur la différenciation des Th naïf en Th1 via l'IL-12 alors que la T-2 agirait plutôt sur la sécrétion de cytokine pro-Th1 comme l'IFN-γ. De façon intéressante, la toxine T-2 et le DON induisent une up-régulation significative de l'expression des gènes IL-6, IL-1β et IL-23, impliqués dans la différenciation lymphocytaire vers la voie IL-17 (figure 1C), bien que ces niveaux d'expression semblent dépendre de la nature de la toxine à laquelle les cellules sont exposées. A souligner également que l'expression du gène TGF-beta (TGF-β), décrit pour être une cytokine importante aussi bien au cours de la différenciation des Th17 que des Tregs ne semble pas être affectée par l'exposition à ces deux toxines (figure 1C). Même si DON et la toxine T-2 induisent un profil de différenciation comparable, elles n'induisent pas le même profil d'expression des gènes

impliqués dans la production des cytokines de la voie IL-17 (figure 1D). En effet, les gènes des cytokines IL-23 et IL-22 sont de façon significative 13 et 2 fois respectivement, plus induits en présence de toxine T-2 qu'en présence de DON. De plus, il est à noter que seule la toxine T-2 semble induire une augmentation significative de l'expression de l'IL-21.

Comme décrit préalablement par l'équipe, le DON diminue significativement l'expression des gènes RALDH (0,21 +/- 0,03) et FoxP3 (0,36 +/-0,09). En revanche, la toxine T-2 n'induit pas d'effet significatif sur l'expression de ces deux gènes impliqués dans la voie de différenciation des Tregs (figure 1D).

Les cellules épithéliales intestinales influencent le recrutement des cellules dendritiques suite à une exposition au DON et non à la toxine T-2

Suite aux résultats obtenus précédemment avec un modèle complexe que représentent les explants, nous avons étudié plus spécifiquement l'effet de ces deux toxines sur les IECS en utilisant une lignée de cellules épithéliales intestinales porcines (IPEC-1). Ces résultats montrent que si le DON induit une augmentation significative de l'expression des gènes pro-inflammatoires IL-1α, TNF-α, IL-6, IL-8, la toxine T-2 induit seulement une augmentation significative de l'IL1α (figure 2A). Outre son rôle dans la mise en place d'une inflammation, les IECs sont connues pour intervenir dans divers type de processus biologique et sécrètent notamment des facteurs impliqués dans mise en place de la réponse humorale tels que BAFF, TSLP et également IgA (figure 2B). Ils interviennent également dans la différenciation des Tregs (via la sécrétion de facteurs tels que TGF-β ou l'acide rétinoïque grâce à une enzyme, la RALDH) (figure 2C). Quelque soit le traitement (DON ou T-2), aucun changement significativement différent n'a été observé sur l'ensemble des gènes testés initiant ces deux processus. En revanche, concernant l'expression des chémokines, molécules impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires (figure 2D), nous avons observé une augmentation significative de l'expression du gène CCL20 (23,42 +/- 4,95) par rapport au contrôle en réponse à une exposition au DON. Cependant, l'expression de cette chémokine n'est pas modulée par la toxine T-2. De façon intéressante, il est à noter qu'une exposition à ces deux toxines entraine une diminution de l'expression du gène CX3CL1, chémokine impliquée de façon préférentiel dans le recrutement des cellules $CX3CR1^{+}$ correspondant aux

macrophages et DCs. Cependant, seule la toxine T-2 diminue l'expression de ce gène de façon significative (de 2,78 fois moins par rapport au contrôle).

Le DON et la toxine T-2 perturbent la maturation des MoDCs à des doses non cytotoxiques

Les cellules dendritiques sont des cellules sentinelles de l'organisme capables de présenter les peptides antigéniques aux lymphocytes T naïfs et ainsi d'initier les réponses immunitaires. Cependant, cette fonction n'est possible qu'après leur maturation. Nous avons évalué l'effet du DON et de la toxine T-2 sur la maturation des cellules dendritiques par l'utilisation d'un modèle *in vitro* de cellules dendritiques dérivées des monocytes sanguins (MoDCs) porcin. En premier lieu, une étude de cytotoxicité nous a permis de déterminer les IC_{50} respectives de chacune des deux toxines selon l'état de maturation des DCs (figure 3A). Nous avons montré que la toxine T-2 s'avère 100 fois plus toxique que le DON indépendamment de l'état de maturation des MoDCs.

En absence de toxines, l'ajout de cocktail de stimulation (IFN-α, TNF-α, LPS) permet d'obtenir des MoDCs à l'état mature comme le montre l'augmentation significative de l'expression du MHCII (figure 3B) et du CD80/86 (figure 3C), respectivement, de 70% et de 30% par rapport aux MoDCs immatures validant ce cocktail de maturation des MoDCs. De façon intéressante, nous observons une inhibition significative de la maturation de ces cellules avec de très faibles concentrations de DON ou de toxine T-2, correspondant à respectivement des doses 400 ou 40 fois moins élevées que l'IC_{50} du DON ou de la toxine T-2.

L'ensemble des sous-populations de Tregs ($CD4^+$Tregs, $CD8^+$Tregs et CD4+$CD8^+$Tregs) sont les cibles du DON et de la toxine T-2

Lors d'une étude préliminaire, nous avons effectué un marquage IP/annexin, afin de déterminer les doses en toxines produisant pas d'effet toxique sur des cultures primaires de PBMCs. Les doses à partir desquelles il n'est pas détecté d'apoptose sur ce modèle cellulaire sont pour le DON (1µM) et pour la toxine T-2 (3nM) (données non montrées). Nous avons alors testé l'effet d'une exposition à ces deux toxines sur la fréquence de différenciation des sous-populations de Tregs, à savoir les Tregs $CD4^+$ (figure 4A), les Tregs $CD8^+$ (Figure 4B) et les Tregs $CD4^+CD8^+$ (figure 4C). De façon intéressante, il est à noter qu'une exposition à une faible dose de DON (0,1µM) n'affecte ni le pourcentage des Tregs $CD4^+$ ni celui des Tregs

$CD8^+$, seule la population Tregs double positive est diminuée de façon significative par rapport au contrôle non traité.

La sous-population de Tregs $CD4^+$ semble la moins affectée par les trichothécènes (figure 4A). En effet, seule une exposition à 0,5 µM de DON réduit de façon significative le pourcentage de Tregs $CD4^+$ (diminution de 17%, par rapport au contrôle négatif). Les sous-populations de Tregs $CD8^+$ et double positives $CD4^+CD8^+$ semblent plus affectées par le DON que par la toxine T-2. En effet, nous avons observé une diminution significative du pourcentage de cellules Tregs $CD8^+$ en présence de faibles doses de DON (diminution par rapport au contrôle de 60% et de 40% en présence de 1 et de 0,5 µM de DON, respectivement) alors que la toxine T-2 induit une diminution significativement différente de 14% à une concentration de 0,3 nM (figure 4B). La sous-population Tregs $CD4^+CD8^+$ semble la plus sensible aux trichothécènes. En effet, leur pourcentage est significativement réduit quelque soit les doses de DON ou de T-2 testées. De faibles doses de toxines diminuent de façon significative le pourcentage de Tregs $CD4^+CD8^+$ (diminution de 17% en présence de 0,1 µM de DON versus 25% en présence de 0,3 nM de toxine T-2) (figure 4C).

Le DON et la toxine T-2 induisent la production d'IL-17A préférentiellement par les cellules $TCR\gamma\delta^+$ et non par les cellules Th $CD4^+$

Comme nous l'avons montré précédemment par des analyses transcriptomiques, le DON comme la T-2 sont des inducteurs d'une inflammation de type IL-17 (Seeboth et al., 2013). Nous nous sommes alors proposé d'évaluer l'impact de ces deux trichothécènes sur les deux sous-populations lymphocytaires productrices d'IL-17A décrites chez le porc en utilisant des cultures primaires de PBMCs. Chez cette espèce, deux sous-populations sont décrites comme ayant la capacité d'induire la production d'IL-17A : les cellules $TCR\gamma\delta^+$ et les cellules T $CD4^+$ (Th17) (Stepanova et al., 2012). L'étude phénotypique en cytométrie de flux a permis de détecter la présence respective d'environ 30% de cellules $TCR\gamma\delta^+$ et 2% de cellules T $CD4^+$ correspondant à ce qui est décrit dans la littérature. Nous n'avons pas noté d'effet des toxines sur ces populations. En revanche, nous avons pu observer une augmentation du pourcentage total de cellules $TCR\gamma\delta^+$IL-$17A^+$ de façon concentration dépendante en présence de DON et de toxine T-2. Ainsi, pour des concentrations de 0,1 ; 0,5 et 1 µM de DON, le pourcentage total de cellules $TCR\gamma\delta^+$IL-$17A^+$ a été respectivement multiplié par 1,5 ; 3,3 et

4,5 par rapport au contrôle sans toxine. La toxine T-2 augmente elle aussi significativement le pourcentage total des cellules TCRγδ^{+}IL-17A^{+} de 3,4 et 2,8 fois après une exposition respective de 3 et de 1 nM (figure 5A). La fréquence de cellules T CD4^{+}IL-17A^{+} représente un pourcentage de cellules extrêmement faible, même dans le groupe sans traitement (0,0375%). Nous n'avons pas noté d'effet du DON sur cette sous-population. En revanche, des concentrations de toxine T-2 de 1 et 0,3 nM diminue significativement cette population lymphocytaire (figure 5B).

Discussion

Considérées comme contaminants naturels des denrées alimentaires, les mycotoxines sont ubiquitaires au niveau mondial et sont à l'origine de problèmes de santé humaine et animale (AFSSA, 2009). Parmi la trentaine de mycotoxines possédant des propriétés toxiques, le DON et la toxine T-2, tous les deux faisant partie de la famille des trichothécènes, sont décrits comme modulateurs de la fonction de barrière intestinale (Goossens et al., 2012; Pinton et al., 2011; Pinton et al., 2009) et ciblent préférentiellement les cellules immunitaires (Bimczok et al., 2007; Hymery et al., 2009; Nagata et al., 2001; Pestka and Zhou, 2006; Seeboth et al., 2012). Ainsi, les cellules immunocompétentes présentes au sein des tissus lymphoïdes associés à l'intestin sont les principales cibles de ces toxines. L'équipe a récemment montré qu'une exposition d'explants de jéjunum au DON provoque une perturbation de l'homéostasie intestinale mise en évidence par une réponse pro-inflammatoire élevée associée à la différenciation et à l'activation de la voie IL-17 au détriment de la différenciation des cellules Tregs (Seeboth et al., 2013).

Le principal objectif de cette étude était de comparer l'effet de ces deux trichothécènes sur la balance immunitaire intestinale en se focalisant sur les acteurs immunitaires régulant cet équilibre afin de mieux appréhender leur mode d'action.

Les résultats de cette étude comparative, utilisant le modèle d'explants intestinaux, ont montré qu'une exposition au DON comme à la toxine T-2 stimule de façon similaire les gènes impliqués dans la différenciation (IL-6, IL-1β, et IL-23) ainsi que dans la production des cytokines IL-17A et IL-22 aboutissant dans le deux cas à l'induction de la voie inflammatoire IL-17. Nos précédents travaux ont basé l'induction des cellules Th17 par le DON d'après l'augmentation de l'expression de certains gènes de cytokines responsables de leur

différenciation (TGF-β, IL-23, d'IL-1β, d'IL-6 et d'IL-21) ou produites par ce type cellulaire (IL-17A, l'IL-22 et l'IL-21) (Volpe et al., 2008; Wilson et al., 2007; Zhou et al., 2009). Cependant, au sein de la lamina propria de nombreuses cellules peuvent être à l'origine de la sécrétion de l'ensemble de ces cytokines. En effet, l'IL-1β, l'IL-6 et le TGF-β sont des facteurs également produits par les polynucléaires neutrophiles, monocytes et macrophages mais également par les cellules dendritiques et les cellules épithéliales intestinales. De plus, de nombreuses études très récentes mettent en évidence que les cytokines IL-17 comme l'IL-22, décrites il y a quelques années pour être spécifiquement sécrétées par les cellules Th17, peuvent être également produites par de nombreuses cellules de l'immunité innée. Découvertes récemment et présentes au sein des muqueuses, les cellules lymphoïdes dites « innées » (ILCs) sont capables de produire des profils cytokiniques similaires aux cellules Th17 (Spits and Di Santo, 2010). Ainsi les ILC17 et les ILC22 sont respectivement productrices de large quantité d'IL-17A et d'IL-22 (Spits and Di Santo, 2010). Mais les ILCs ne sont pas les seules sources de ces deux cytokines. En effet, plusieurs équipes ont montré que les cellules Tγδ tout comme les cellules NKT peuvent également sécréter de l'IL-17 et de l'IL-22 (Cua and Tato, 2010; Kim and Jordan, 2012; Sutton et al., 2012). En 2012, Stepanova et son équipe décrivent chez le porc deux populations de lymphocytes T capables de produire de l'IL-17, les lymphocytes $T\alpha\beta^{+}CD4^{+}$ (Th17) et les lymphocytes $T\gamma\delta^{+}$ (Stepanova et al., 2012). Cette présente étude a pu mettre en évidence que l'IL-17A stimulées par le DON comme par la toxine T-2 pourrait être produites par la population de lymphocytes Tγδ. Ainsi, la signature cytokinique « IL-17 » induite par l'exposition aux trichothécènes (DON et toxine T-2) proviendrait préférentiellement des sécrétions faisant intervenir les cellules des défenses innées plutôt que celles des défenses acquises. Le rôle indispensable de l'IL-1α ou l'IL-1β en synergie avec l'IL-23 induit, de façon comparable aux cellules Th17, l'induction de la production de l'IL-17 par les cellules Tγδ aussi bien chez la souris que chez l'Homme (Caccamo et al., ; Ma et al., 2011; Sutton et al., 2009). Nos résultats, obtenus sur les explants d'intestin, vont également dans ce sens, l'expression des gènes IL-1α/β, IL-6 et IL-23 étant induite de façon significative en présence de DON et de T-2. De plus, nous observons une induction d'IL-21 seulement en présence de T-2. L'IL-21 est une cytokine impliquée dans la régulation de l'homéostasie, la différenciation des lymphocytes B mémoires, la maintenance de la réponse cellulaire T CD8+ et la différenciation des cellules Tγδ productrices d'IL-17.

L'étude de Micci et al. (2012) ainsi que les travaux récents de Liu et al., 2013 décrivent une nouvelle population de cellules T CD4+ CCR6- productrices d'IL-17 $CD4^{+}CCR6$- (Liu et al., 2013b; Micci et al., 2012). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que si la cible préférentielle du DON est la population lymphocytaire Tγδ productrice d'IL-17, la toxine T-2 pourrait avoir pour cible également les cellules T inflammatoires productrices d'IL-21. Cette hypothèse reste cependant à montrer par un marquage spécifique de cette sous-population. Cette hypothèse peut également s'appuyer sur les résultats transcriptomiques qui nous avons obtenu avec le modèle *in vitro* d'IECs montrant une distinction de réponse sur les molécules induisant le recrutement des cellules immunitaires toxine-dépendant. En effet, la toxine T-2 n'induit pas l'expression de CCL20 et donc ne permet pas le recrutement des cellules $CCR6^{+}$ à l'inverse du DON. CCL20 est le ligand du récepteur de surface CCR6 localisé notamment sur les ILCs (McDonald et al., 2007; Sonnenberg et al., 2011; Spits and Di Santo, 2010). En accord avec les résultats décrits précédemment dans le cas d'une exposition au DON, l'augmentation significative de CCL20 pourrait favoriser le recrutement des cellules Tγδ $IL\text{-}17^{+}$.

CX3CL1 est également indispensable au recrutement des lymphocytes T, NKT, macrophages et DCs exprimant à leur surface le récepteur CX3CR1 (Nicoletti et al., 2010). Au niveau intestinal, Nicoletti et al. (2010) montrent l'importance de l'expression de CX3CR1 sur les DCs, lequel joue un rôle vital dans l'intestin car il est fondamental pour la migration trans-épithéliale des DCs (Nicoletti et al., 2010). En effet, 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, capables alors d'activer les lymphocytes Th naïfs (Farache et al., 2013). Dans cette étude, nous avons observé une diminution de l'expression du gène CX3CL1 par les IECs en réponse aux trichothécènes. Ce résultat suggère un défaut de recrutement des cellules $CX3CR1^{+}$ entrainant une dérégulation de l'équilibre immunitaire. Nous n'avons noté aucun changement concernant l'expression des gènes BAFF et IgA, facteurs impliqués principalement dans la réponse humorale et le recrutement des lymphocytes B en réponse au DON et à la toxine T-2 (Schneider et al., 1999). Plusieurs équipes ont déjà décrit un effet du DON et de la toxine T-2 sur la maturation des DCs *in vitro* et *in vivo* aussi bien chez l'homme (Hymery et al., 2009; Hymery et al., 2006) que chez le porc (Bimczok et al., 2007). Ainsi, Bimczok et al. (2007) montrent qu'une exposition

DCs dérivées de monocytes sanguins de porc au DON de diminue l'expression des marqueurs CD80/86 et CD40. Cette équipe a également montré une inhibition de la capacité de maturation des cellules dendritiques provenant de porcs nourris avec une alimentation contaminée par 3,5 à 4 mg DON/kg d'aliment correspondant approximativement à une exposition de 10 µM dans la lumière intestinale. Dans cette étude, nous avons observé des effets similaires d'inhibition de la maturation des DCs en présence de DON et de toxine T-2. Ainsi, une exposition aux trichothécènes contribuerait au maintien des DCs à un stade immature entrainant un défaut de présentation antigénique et de différenciation des lymphocytes Th naïfs en Th effectrices, notamment en Th17.

Nous avons également observé des distinctions de réponses entre les deux toxines sur la voie de différenciation des Tregs. En effet, seul le DON diminue significativement les facteurs relatifs à la différenciation des Tregs (FoxP3 et RALDH). De plus, ces travaux montrent que l'exposition de PBMCs à de faibles doses de trichothécènes conduit à une diminution de l'ensemble des sous-populations de Tregs. Ces doses n'étant pas cytotoxiques, cette diminution serait due à une interférence dans le processus de différenciation des lymphocytes $CD4^+$ en lymphocytes Tregs. De façon intéressante, nous avons observé que les populations de Tregs induites, les iTregs $CD8^+$ et les Tregs $CD4^+CD8^+$ mémoires sont les plus sensibles à ces toxines.

L'ensemble de ces résultats a permis de montrer l'induction par ces deux trichothécènes d'une réponse inflammatoire comparable au niveau intestinal reposant sur la mise en place d'une réponse pro-inflammatoire associée à une inflammation de type IL-17 médiée préférentiellement par les cellules Tγδ. Cependant, les mécanismes d'initiation de cette réponse semblent être différents entre le DON et la toxine T-2 puisque seul le DON module la réponse des IECs via le recrutement des cellules $CCR6^+$.

La présence de ces toxines pourrait contribuer à la persistance des IBD par la production d'IL-17 et la diminution des sous-populations de cellules Tregs (Brimnes et al., 2005; Faunce et al., 2004; Taams et al., 2006; Tennakoon et al., 2006), deux mécanismes largement mis en cause dans l'apparition des maladies intestinales telles que la maladie de Crohn ou les colites ulcératives (Annunziato et al., 2007; Fujino et al., 2003; Pandolfi et al., 2009). Il serait à présent intéressant d'évaluer les effets de ces toxines sur les cibles identifiées dans cette étude (cellules Tγδ, ILC et Tregs) issus de la *lamina propria* lors d'une exposition *in vivo* des

animaux au DON et à la toxine T-2 en étudiant notamment l'impact de ces toxines sur leur fonctionnalité.

Figures et légendes

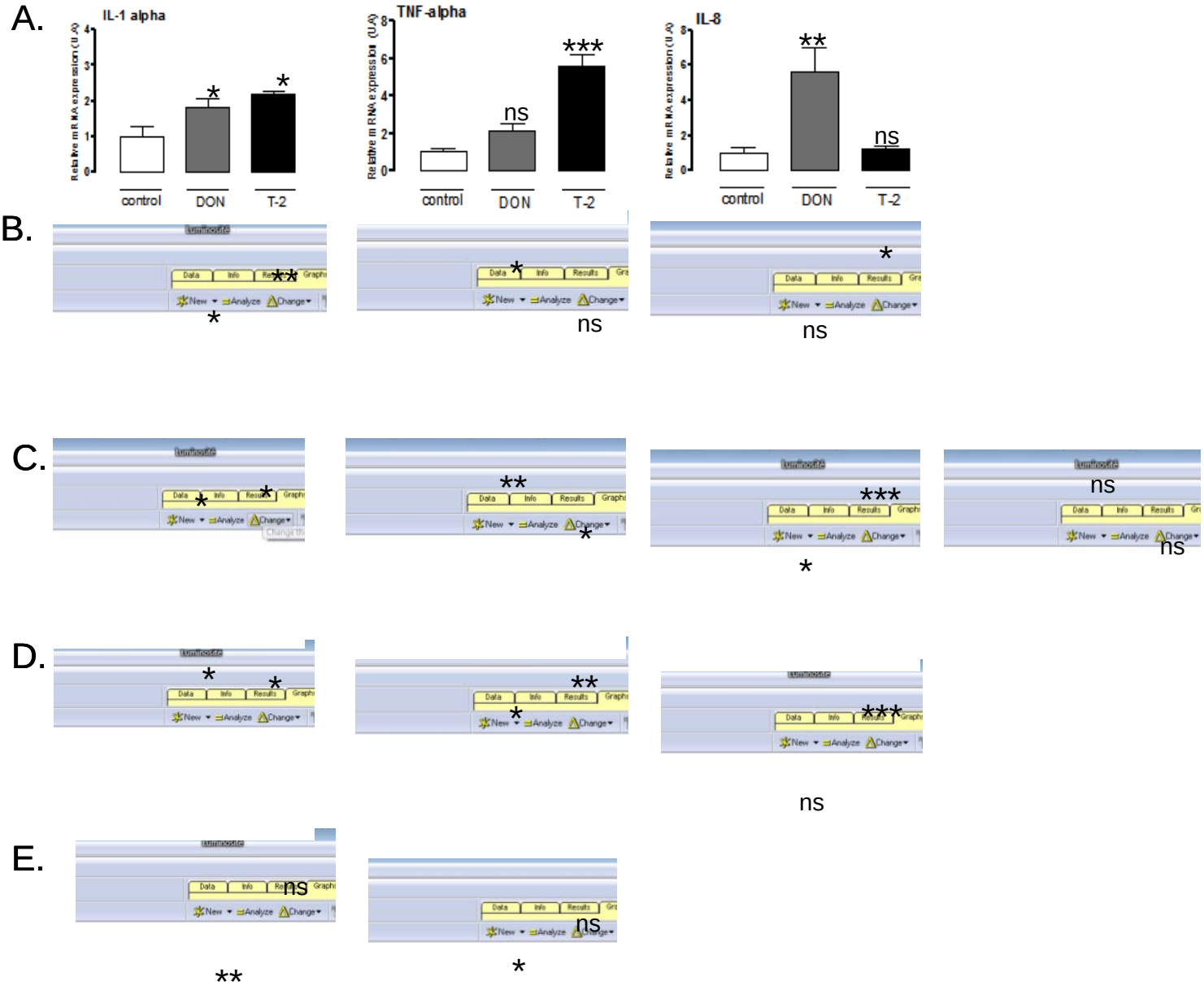
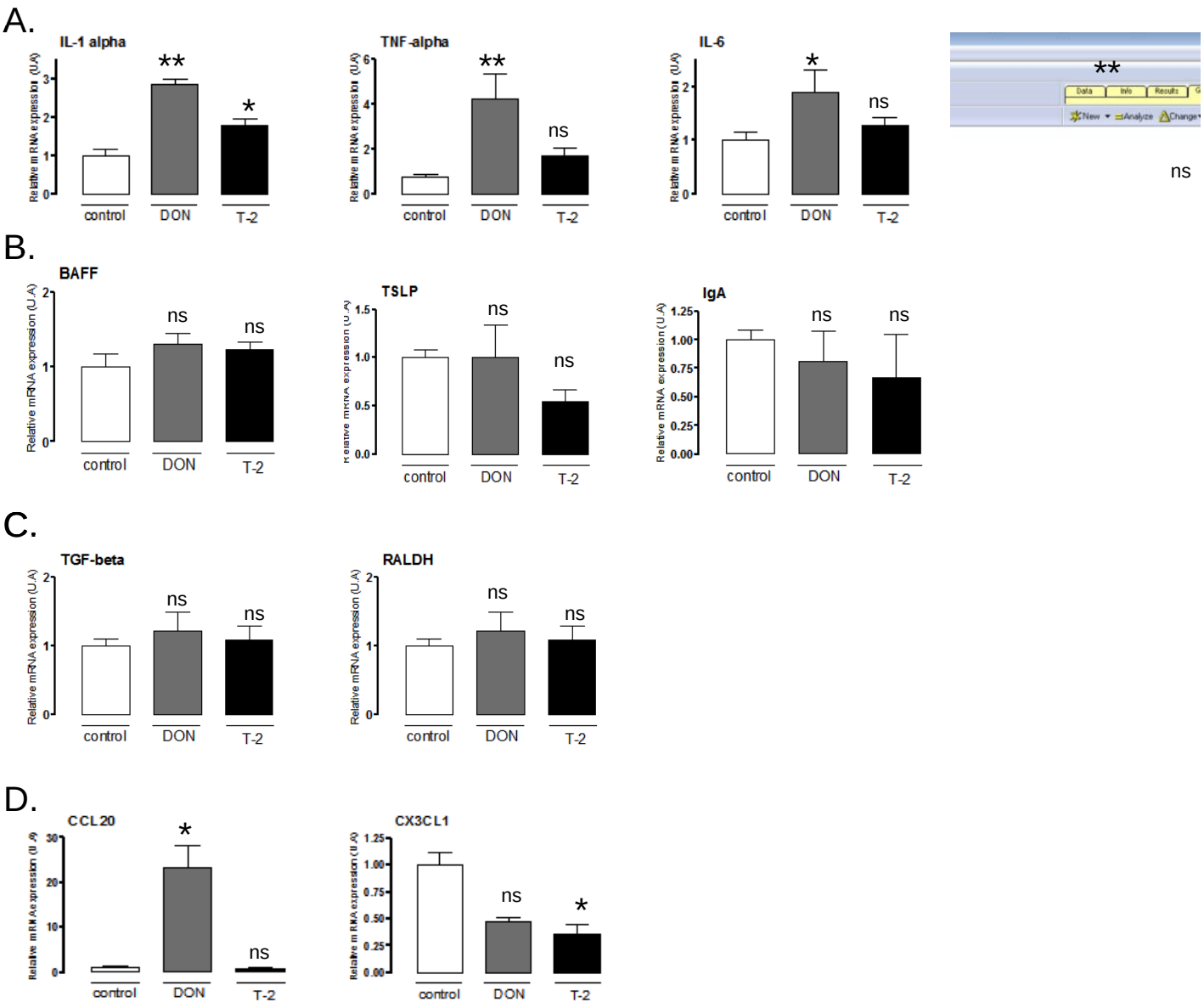


Figure 1

<u>Figure 1:</u> La toxine T-2 et le DON modulent l'état pro-inflammatoire (A) et la réponse Th1/Th2 (B), induisent l'expression mRNA des facteurs liés à la différentiation des Th naïves (C) et de la signature cytokinique IL-17 (D) mais seul le DON affecte significativement la réponse Treg (E) dans un modèle *ex vivo* d'explants intestinaux de porc. Les explants intestinaux de porc (n=6) sont mis en culture en présence de 10 µM de DON (histogrammes gris) ou de 3 nM de toxine T-2 (histogrammes noirs) pendant 1h puis maintenus en culture pendant 3h. L'expression des gènes est analysée par RT-qPCR et est normalisée par deux gènes de ménages (Cyclophilin A and RPL32). Les données représentent les valeurs moyennes +/- SEM obtenues à partir de six animaux différents. Les valeurs d'expression des gènes sont exprimées de façon relative au groupe contrôle sans toxine (histogrammes blancs). Les astérisques indiquent les différences significatives obtenues par rapport au groupe contrôle : * $P < 0,05$ et **$P < 0,01$.



<u>Figure 2:</u> Le DON, mais pas la toxine T-2, induit une inflammation (A) et un recrutement des cellules immunitaires (B) alors qu'aucune de ces toxines ne module les facteurs induisant la réponse humorale (C) ou la différenciation des Tregs (D) dans un modèle *in vitro* d'IPEC-1. Les cellules de la lignée épithéliale intestinale de porc (IPEC-1) est mise en culture en présence soit de 10 µM de DON (histogrammes gris) soit de 3 nM de toxine T-2 (histogrammes noirs) comme décrit précédemment dans le modèle d'explants intestinaux. L'expression des gènes est analysée par RT-qPCR et est normalisée par deux gènes de

ménages (Cyclophilin A and RPL32). Les données représentent les valeurs moyennes +/- SEM obtenues à partir de quatre cultures indépendantes. Les valeurs d'expression des gènes sont relatives au groupe contrôle sans toxine (histogrammes blancs). Les astérisques indiquent les différences significatives obtenues par rapport au groupe contrôle : * P < 0,05 et **P < 0,01.

A.

	MoDCs immatures	MoDCs matures
IC_{50} DON	400 nM +/- 150	530 nM +/- 230
IC_{50} T-2 toxin	4.42 nM +/- 1.02	4.85 nM +/- 1.12

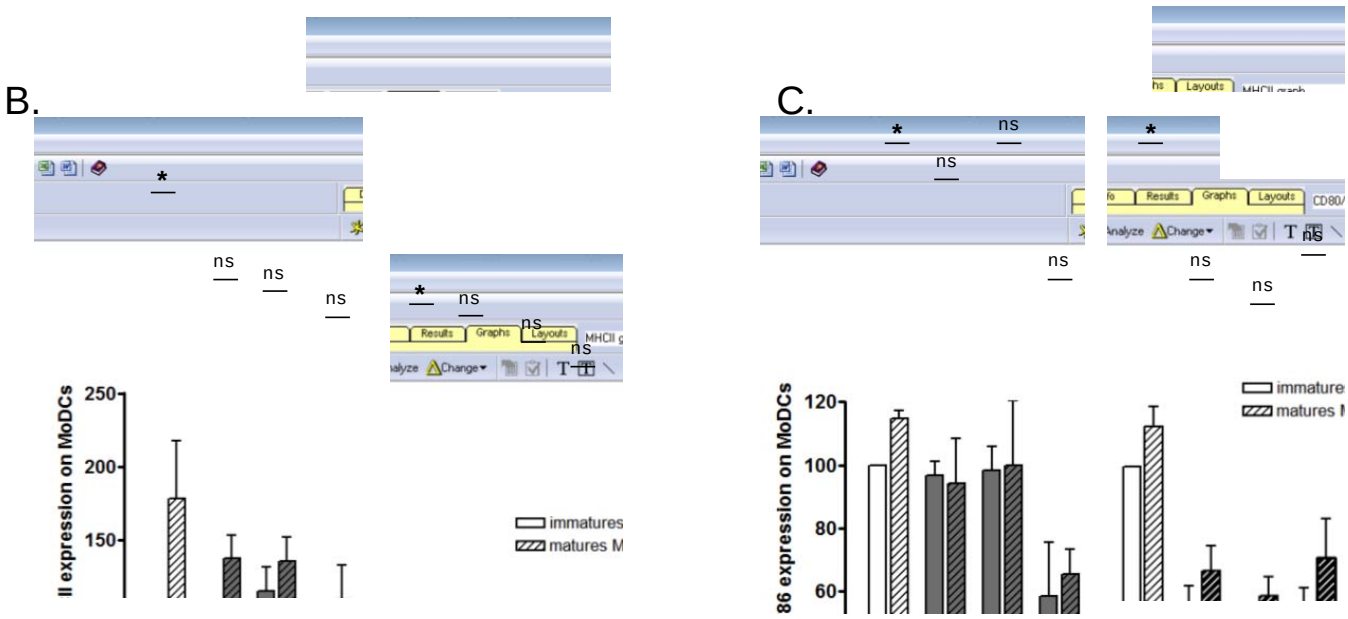


Figure 3

<u>Figure 3:</u> Etude de la cytotoxicité des trichothécènes (DON et T-2) sur un modèle *in vitro* de DCs dérivées de monocytes sanguins (MoDCs) de porc (A) et analyse de leurs effets sur l'expression de marqueurs de maturation des DCs (B). Le tableau 3A présente les IC_{50} +/- SEM du DON et de la toxine T-2 sur des cultures primaires de MoDCs immatures ou matures. La cytotoxicité de ces deux toxines est réalisée à l'aide du test CelltiterGlo. Ce test est basé sur la quantification de l'ATP dans le milieu considéré comme le reflet du métabolisme actif des cellules vivantes. Les IC_{50}, de chacune de ces toxines sont calculées à l'aide du logiciel Sigmaplot et obtenus à partir de trois prélèvements différents de MoDCs exposées à différentes concentrations de DON (100 ; 10 ; 1 ; 0,1 ; 0,01 ; 0,001 et 0,0001 µM) ou de toxine T-2 (300 ; 100 ; 30 ; 10 ; 3 ; 1 ; 0,3 ; 0,1 nM) pendant 48h en présence ou non d'un cocktail de maturation : LPS (20 µg/ml), TNF-α (1µg/ml) et IFN-alpha porcin recombinant (1000 U /ml). Trois expérimentations indépendantes sont réalisées sur des MoDCs immatures (histogrammes non hachurés) et matures (histogrammes hachurés) exposées à différentes doses de DON (0,01 ; 0,1 ; 1 µM) (histogrammes gris) ou de toxine T-2 (0,1 ; 1 ; 3 nM) (histogrammes noirs) pendant 48h (Figure 3B). Les valeurs correspondent à la moyenne +/- SEM des triplicats. L'expression des marqueurs MHCII (B) et CD80/86 (C) est calculée de façon relative par rapport au contrôle sans toxine (histogrammes blancs). Les astérisques représentent les différences significatives entre les valeurs obtenues pour les MoDCs immatures et les MoDCs matures : * $P < 0,05$.

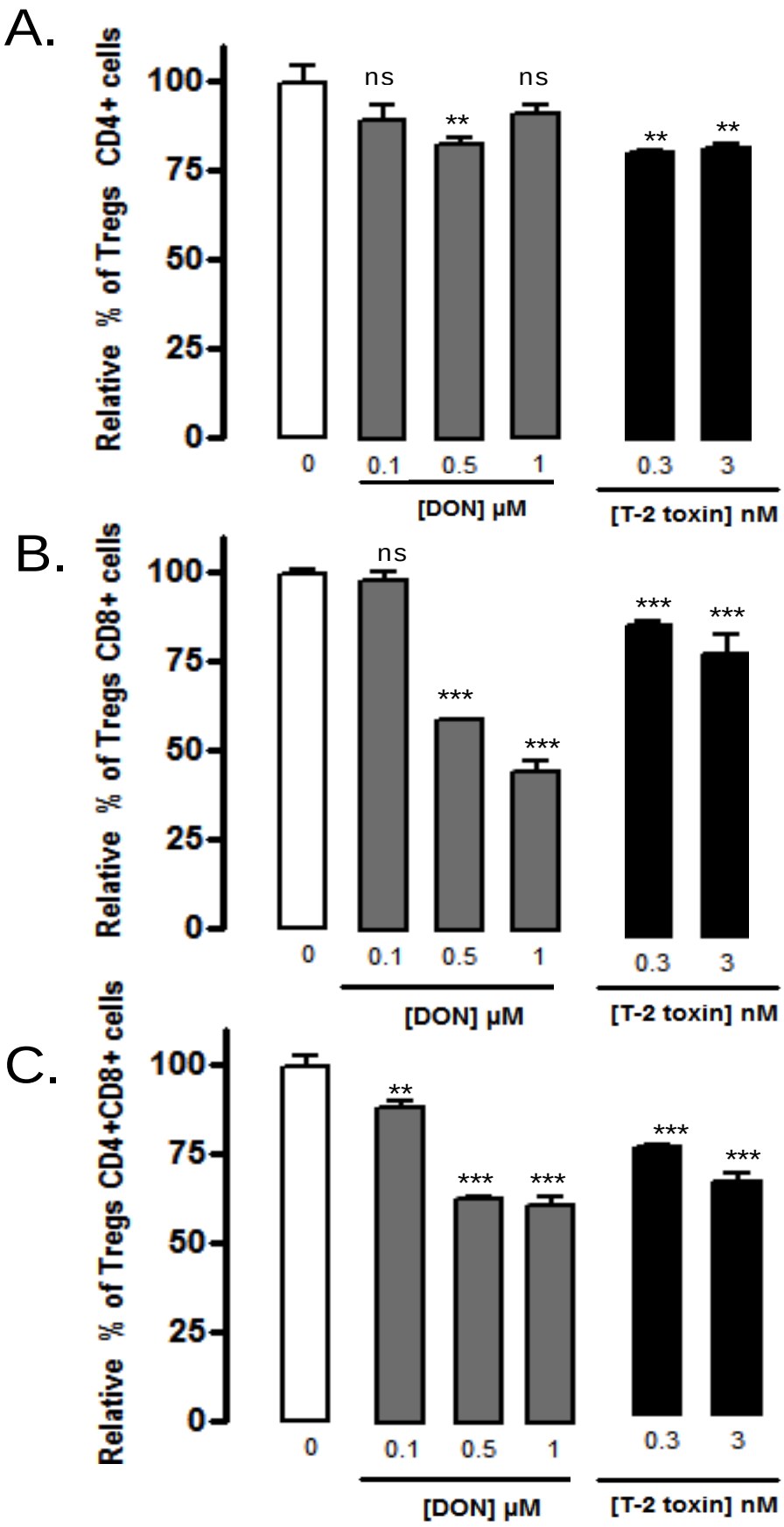

A.
Relative % of Tregs CD4+ cells
100
75
50
25
0
ns
ns
**
**
**
0
0.1
0.5
1
0.3
3
[DON] µM
[T-2 toxin] nM
B.
Relative % of Tregs CD8+ cells
100
75
50
25
0
ns
***
***
***
***
0
0.1
0.5
1
0.3
3
[DON] µM
[T-2 toxin] nM
C.
Relative % of Tregs CD4+CD8+ cells
100
75
50
25
0
**
***
***
***
***
0
0.1
0.5
1
0.3
3
[DON] µM
[T-2 toxin] nM

Figure 4

Figure 4: Le DON et la toxine T-2 diminuent les sous populations de Tregs : $CD4^+$Tregs (A), $CD8^+$Tregs (B) et $CD4^+CD8^+$Tregs (C). Des PBMCs sont exposées à des concentrations croissantes non cytotoxiques de DON (0,1 ; 0,5 et 1 µM) ou de toxine T-2 (0,3 et 3 nM). Les marquages CD4/CD8/CD25/FoxP3 ont été réalisés après 48h d'incubation en présence de DON (histogrammes gris) ou de toxine T-2 (histogrammes noirs) et analysés par cytométrie en flux. Les graphiques représentent la moyenne +/- SEM provenant de culture de PBMCs isolées à partir de quatre porcs différents. Les données sont calculées de façon relative par rapport au groupe contrôle n'ayant reçu aucun traitement (histogrammes blancs). Les différences significatives entre le groupe contrôle et les groupes traités sont notées par des astérisques : **P < 0,01; *** P < 0,001.

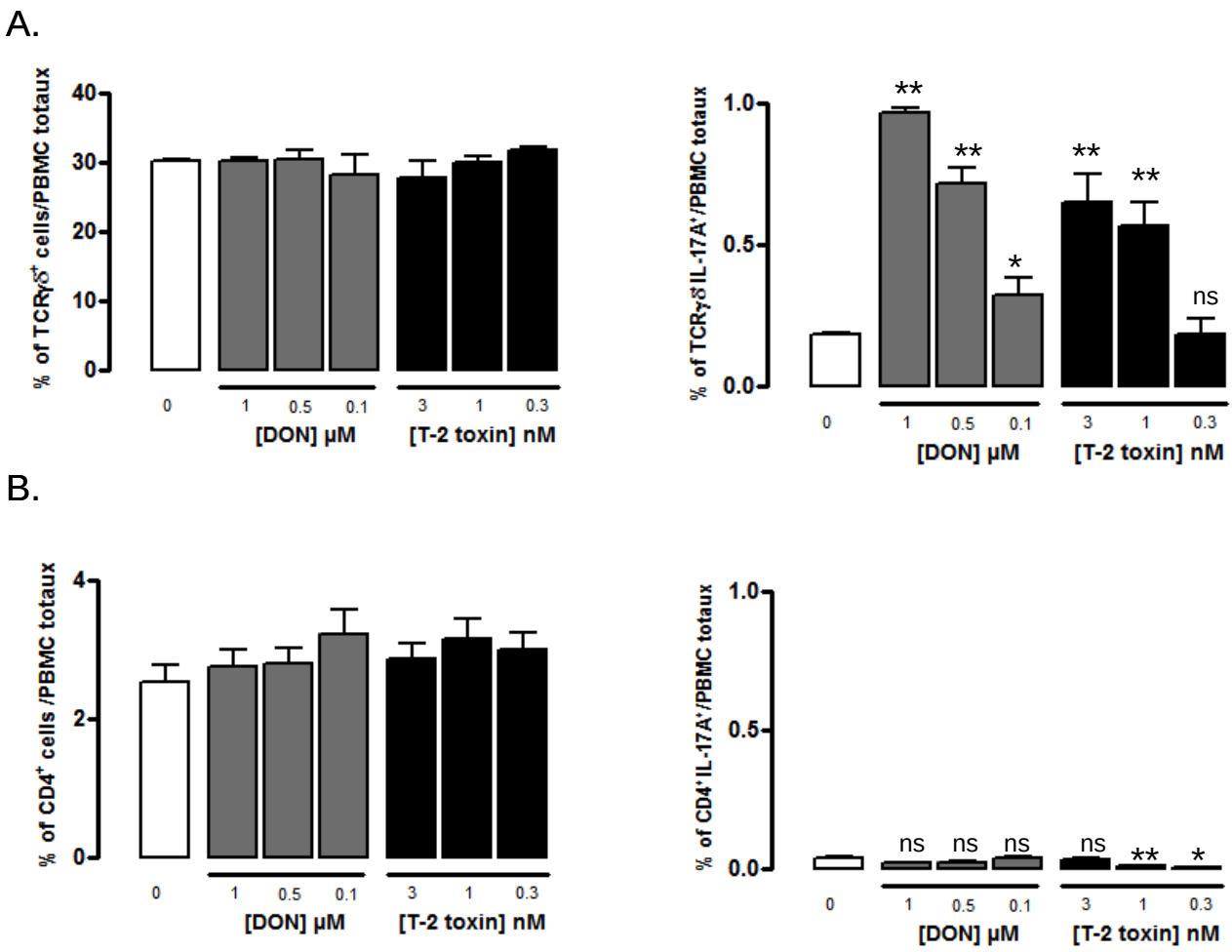


Figure 5

Figure 5: Le DON et la toxine T-2 induisent de façon préférentielle la différenciation des cellules Tγδ. Des PBMCs porcins sont mis en culture pendant 5h en présence ou non de différentes concentrations de DON (0,1 ; 0,5 et 1 µM) (histogrammes gris) ou de toxine T-2 (0,3 ; 1 et 3 nM) (histogrammes noirs). A la fin de cette incubation, deux marquages distincts sont réalisés : TCRγδ/IL17 (A) et CD4/IL-17 (B) puis les cellules sont analysées par cytométrie en flux. Les valeurs représentent les moyennes +/- SEM de trois expériences indépendantes. Un contrôle négatif sans toxine (histogrammes blancs) est réalisé et toutes les valeurs obtenues sont calculées de façon relative par rapport au contrôle négatif. Les différences significatives entre le groupe contrôle et les groupes traités sont notées par des astérisques : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

ETUDE 3 :

Méthode alternative utilisant la souche de bactérie commensale, *Lactobacillus sobrius 16698T,* pour limiter les effets inflammatoires générés par les trichothécènes : Cas du déoxynivalénol et de la toxine T-2 chez le porc

Comme décrit précédemment, les mycotoxines sont des structures chimiques très variées et sont considérées comme contaminants naturels de tous types d'environnements. De plus, elles présentent pour plus d'une trentaine d'entre-elles des effets toxiques à l'égard des hommes et des animaux. La réduction de la production de ces mycotoxines nécessitent d'envisager des méthodes de décontamination des mycotoxines. De nouvelles stratégies utilisant des méthodes biologiques telles que les probiotiques sont étudiées.

Dans le second chapitre de ce travail de thèse, les auteurs ont montré que la toxine T-2 et le DON induisent des effets fortement inflammatoires au niveau de la muqueuse intestinale chez le porc. En effet, quelque soit la toxine testée, il a été observé une induction de la inflammation innée associée à une induction de la voie inflammatoire IL-17. Retrouvée de façon abondante dans l'intestin chez le porc et révélant de nombreuses propriétés anti-inflammatoire au niveau intestinal, *L. sobrius 16698T* semble être un bon candidat pour tenter de limiter les effets inflammatoires induits par les trichothécènes.

Ce dernier volet expérimental s'est proposé d'étudier les effets de la souche bactérienne commensale *L.sobrius* DSM 16698T sur les réponses inflammatoires intestinales initiées par la toxine T-2 et par le DON au niveau du GALT. Ce travail a été effectué dans le cadre du projet européen « INTERPLAY ».

Résumé

Le déoxynivalénol (DON) et la toxine T-2 sont les deux mycotoxines les plus répandues de la famille des trichothécènes. Elles sont mondialement retrouvées dans les produits céréaliers et sont considérées comme contaminants naturels des denrées alimentaires entrainant des problèmes de santé animale. L'intestin représente la première cible de ces contaminants. Elles sont connues pour perturber aussi bien les réponses immunitaires que les fonctions de la barrière intestinale. De nouvelles méthodes alternatives utilisant des souches de commensales sont utilisées pour contrecarrer les effets de ces toxines. Le but de cette étude était d'évaluer *in vitro* et *ex vivo* l'effet de la souche *Lactobacillus sobrius* DSM 16698T en réponse à une pré-exposition à deux mycotoxines : le DON et la toxine T-2. L'étude des réponses immunitaires a été effectuée à travers des méthodes transcriptomiques (qPCR) ainsi que par phénotypage des cellules Tregs par cytométrie en flux. La perméabilité para- et trans-cellulaire et la résistance électrique (R) ont été également analysées. Les résultats de cette étude montrent un effet bénéfique de *L. sobrius* DSM 16698T sur les voies de production de l'IL-17 uniquement lorsque cette inflammation est induite par le DON et non en présence de toxine T-2. En revanche, cette souche ne module pas la voie T régulatrice. De plus, la présence de *L. sobrius* DSM 16698T permet de rétablir la R et la perméabilité transcellulaire affectée lors d'une exposition au DON. Ainsi, cette étude montre que les propriétés protectrices de cette souche telles que la régulation de la tolérance via la diminution de la réponse IL-17, la stimulation de l'immunité et le renforcement de la barrière intestinale peuvent être utilisées pour contrecarrer les effets néfastes de certaines mycotoxines tels que le DON au niveau intestinal.

Introduction

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par les champignons. Elles sont retrouvées de façon ubiquitaire au niveau mondial (European-commission, 2003; Wannemacher and Wiener, 1991) et sont considérées comme contaminants naturels des denrées alimentaires notamment dans les céréales. Parmi les mycotoxines, la famille des trichothécènes regroupent des molécules ayant des structures chimiques très variées incluant le déoxynivénol (DON) et la toxine T-2 (T-2). Ces deux trichothécènes sont connus et décrits dans de nombreuses études pour induire des effets toxiques chez l'Homme et les

animaux après ingestion (AFSSA, 2009; Bryden, 2007; Pestka and Smolinski, 2005). Cependant mêmes les bonnes pratiques agricoles tels que l'irrigation des sols et les rotations des cultures ne permettent pas leur élimination (Kabak et al., 2006). Ainsi, la réduction de leur présence dans les aliments nécessite d'envisager des méthodes de décontamination (Bryden, 2012). Ces méthodes regroupent de nombreuses approches qui peuvent être de nature physique, chimique ou biologique. L'approche physique la plus efficace consiste à trier les grains moisis et contaminés éliminant ainsi la majeure partie des toxines (Meister, 2004; Trenholm et al., 1991). Les approches chimiques peuvent compléter ou suppléer les méthodes physiques. Elles sont basées sur l'inactivation des mycotoxines par ozonation ou ammonisation. Cependant, ces méthodes n'éliminent pas ou ne dégradent pas entièrement les mycotoxines. De plus, une modification de la structure moléculaire des trichothécènes peut engendrer des changements dans leurs activités biologiques sans toutefois induire nécessairement une réduction de leur toxicité (He et al., 2010). D'autres approches dites alternatives utilisent alors des additifs tels que des adsorbants inorganiques (les argiles, la bétonite) ou organiques (le charbon actif, les parois de levures ou de bactéries). Mélangées à l'alimentation, ces molécules adsorbent les toxines et limitent ainsi leurs adsorptions au niveau du tractus gastro-intestinal. D'autre part, l'utilisation des micro-organismes (levures ou bactéries) pour la détoxification des mycotoxines représente une nouvelle voie de recherche très prometteuse avec un réel potentiel économique à la fois pour l'industrie agro-alimentaire et céréalière. De nombreux micro-organismes ou éléments de ces micro-organismes isolés à partir du sol, de compost, de rumen ou encore d'insectes ont été sélectionné et triés selon leur capacité à modifier ou à inactiver les mycotoxines (Pedrosa et al., 2010). Certaines bactéries commensales ont la capacité de lier des mycotoxines (El-Nezami et al., 1998; El-Nezami et al., 2002b; Haskard et al., 2001; Peltonen et al., 2001). Cependant, outre la capacité de liaison toxine-microorganisme, la détoxification microbiologique repose également sur la capacité de leur enzyme à dégrader ou métaboliser les mycotoxines en des métabolites peu ou pas toxiques pour l'animal par utilisation de microorganismes présents au niveau du système digestif (Pedrosa et al., 2010).

Dans ce travail, nous avons appuyé l'hypothèse, non pas sur les capacités de liaison de ces bactéries avec les mycotoxines mais sur les potentiels effets protecteurs de bactéries commensales sur les différentes fonctions (fonction de barrière intestinale et/ou capacité à

moduler les réponses immunitaires au sein de la *lamina propria*), fonctions connus pour être altérées par l'ingestion des trichothécènes (DON et T-2). En effet, des études précédentes ont montré que le DON et la toxine T-2 peuvent compromettre l'intégrité et la fonction de cette barrière (Goossens et al., 2012; Pinton et al., 2012a). Le DON altère la perméabilité intestinale par diminution de l'expression protéique des jonctions serrées comme les claudines 3 et 4, ZO-1 et l'occludine (Pinton et al., 2010; Pinton et al., 2009; Pinton et al., 2012b). De plus, récemment, Gossens et al. (2012) montrent que ces deux trichothécènes augmentent la perméabilité intestinale aux antibiotiques (Goossens et al., 2012). De faibles doses de DON et de toxine T-2 peuvent également induire des dégâts morphologiques et histologiques sur les cellules épithéliales intestinales (IECs) telles que des atrophies ou la fusion des villosités (Kolf-Clauw et al., 2013; Pinton et al., 2012b). Ce phénomène a également des conséquences négatives pour la mise en place des réponses immunitaires au niveau intestinal car ces IECs interviennent comme moyen de défense grâce à leur capacité à sécréter des cytokines pro-inflammatoires ou des chémokines impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires au sein de la *lamina propria* (macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes) (Oswald, 2006). En plus d'altérer les fonctions de la barrière intestinale, les trichothécènes sont également connus pour leur immuno-cytotoxicité (Bimczok et al., 2007; Hymery, 2006; Luongo et al., 2010; Pestka and Zhou, 2006; Seeboth et al., 2012). De récentes études ont montré l'implication du DON et de la toxine T-2 dans l'initiation d'une pro-inflammation et notamment dans l'induction de la voie inflammatoire IL-17 au niveau de la muqueuse intestinale chez le porc (Seeboth et al., 2013). Ces travaux ont permis également de mettre en évidence, lors d'une exposition à ces deux trichothécènes, une diminution des différentes sous-populations de cellules T régulatrices (Tregs), acteurs essentiels du maintien de l'homéostasie intestinale (papier en préparation).

De nombreux microorganismes incluant les bactéries productrices d'acide lactique, principalement du genre *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia coli* souche Nissle 1917 et *Saccharomyces* ont montré des effets bénéfiques sur la santé. Ces effets bénéfiques impliquent notamment 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 néonatale de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (LR17938) augmente significativement la fréquence des Tregs (FoxP3+) dans l'iléon (Liu et al., 2013a). De plus, 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, l'entérocolite nécrotique (NEC) (Liu et al., 2013a). D'autres auteurs 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). Ces bactéries commensales peuvent également modulées la fonction de la barrière intestinale. Ainsi, il a été montré que *Lactobacillus salivarius* SMXD51 peut augmenter la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) ainsi 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 la β-défensine 2 (Messaoudi et al., 2012).

L'équipe de Konstantinov et al. (2006) a isolée à partir de l'intestin de porc une nouvelle souche commensale, *Lactobacillus sobrius* DSM 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* DSM 16698T réduit la concentration d'*enterotoxigenic Escherischia coli (*ETEC) dans l'intestin et aide à la croissance des porcelets infectées par cette bactérie pathogène (Konstantinov et al., 2008). Parallèlement à ces observations, Roselli et al, 2007 montrent également un effet protecteur de *L. sobrius* DSM 16698T vis-à-vis d'une infection par des ETEC via l'utilisation d'un modèle *in vitro* d'IPEC-1. Ces auteurs montrent notamment que *L. sobrius* à la possibilité de réduire l'adhésion des ETEC et la réduction du nombre des protéines de jonctions serrées (ZO-1 ou occludine) 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).

En se basant sur ces nombreuses propriétés protectrices, le but de cette étude était d'étudier l'impact de la souche bactérienne commensale *L. sobrius* DSM 16698T sur les modulations de la réponse immunitaire et de la fonction de barrière initiées par le DON et par la toxine T-2 au niveau intestinal.

Matériels et méthodes

Toxines

Les solutions mères des toxines DON et T-2 purifiées (Sigma-Aldrich, Ayshire, UK) ont été reprises dans du dimethylsulfoxide (DMSO) et conservés à -20°C avant d'être diluées dans du milieu de culture. Les échantillons contrôles ont été traités avec des concentrations équivalentes de DMSO.

Culture bactérienne

La souche de *Lactobacillus sobrius* DSM 16698T a été généreusement donnée par le Pr. Elena Mengheri (INRAN, Rome, Italie) dans le cadre du projet Européen INTERPLAY (FP7-KBBE-KBBE-2008-2B). La croissance de cette souche bactérienne est réalisée en milieu de culture liquide MRS (Humeau, La Chapelle-sur-Erdre, France) et nécessite des conditions d'anaérobiose stricte. Une optimisation du temps de mise en culture a été réalisée permettant de déterminer une concentration bactérienne de 1 x 10^9 CFU/ml.

Traitement des explants jéjunaux et des cellules de lignées épithéliales intestinales par le DON et la toxine T-2

Traitement des explants jéjunaux

Dans le respect des règles du comité d'éthique concernant les procédures engageant les animaux de laboratoire, des porcelets âgés de 4 à 5 semaines (n=6) ont été utilisés pour la réalisation des explants à partir de tissu jéjunal d'après la procédure préalablement décrite par Seeboth, Cano et et al. (2012) (Seeboth et al., 2013) (n° de saisine : TOXCOM/0017/IO PP). Des segments de jéjunum d'en moyenne 5 cm ont été collectés dans du milieu de Williams pré-chauffé (Sigma-Aldrich) supplémenté de 200 U/mL de pénicilline et 200 µg/mL de streptomycine (Eurobio, Courtaboeuf, France). Après avoir retirée la musculeuse externe, le jéjunum a été ouvert longitudinalement et a été rincé avec du PBS supplémenté avec 10%

de SVF. Les explants jéjunaux ont été réalisés à l'aide d'un trocart à dissection (Centravet, Lapalisse, France) et ont été mis en culture dans du milieu de Williams contenant 1% de pénicilline/streptomycine, 0,5% de gentamycine (Eurobio), 4,5g/L de glucose (Sigma-Aldrich), 10% de SVF (Eurobio) et 30 mM d'acides aminés (Ala/Glu) (Eurobio). Les concentrations non toxiques en mycotoxine sur ce modèle cellulaire ont préalablement été déterminées (Seeboth et al., publication en préparation, (Seeboth et al., 2013)) ce qui nous a permis de nous affranchir de ce biais. Ainsi, les explants ont été incubés pendant 1h à une concentration non toxique de DON (10 µM), de toxine T-2 (3 nM) ou de DMSO (conditions contrôles). Suite à cette incubation, les explants ont été rincés et remplacés par du milieu de culture sans antibiotique et sans toxine pendant 3 heures à 39°C en présence ou non de $1x10^9$ CFU/ml de *Lactobacillus sobrius* DSM 16698T. Après incubation, les tissus ont été alors récupérés pour une analyse transcriptomique.

Traitement des cellules IPEC-1

La lignée cellulaire IPEC-1 est une lignée porcine de cellules épithéliales intestinales provenant du petit intestin d'un porcelet non sevré (Gonzalez-Vallina et al., 1996). Les cellules IPEC-1 ont été différenciées comme décrit précédemment (Bouhet et al., 2004). En résumé, les cellules sont placées sur des membranes de 4,2 cm2 de polyéthylène téréphtalate comprenant des pores d'une taille de 0,4 µm (Beckon Dickinson, Pont de Claix, France) à une concentration cellulaire de $2x10^5$ cellules par puits dans 1 ml de milieu de prolifération : DMEM F12-HAM (Sigma Aldrich) supplémenté en L-glu 1% (Eurobio), ITS (8,4 µg/ml d'insuline de pancréas de bovin, 7,6 µg/ml de transferrine, 10 ng/ml de sélénium) (Sigma), penicilline/streptamycine 1%, SVF 5% et EGF (5ng/ml) (BD Sciences, Bedford, USA) puis différenciées pendant 10 jours dans du milieu de différenciation (DMEM F12-HAM supplémenté en L-glu 1%, ITS (8,4 µg/ml d'insuline de pancréas de bovin, 7,6 µg/ml de transferrine, 10 ng/ml de sélénium, pénicilline/streptamycine 1%, EGF (5 ng/ml) et dexaméthasone (20 µg/ml) (Sigma). Les traitements sont appliqués au niveau du compartiment apical afin de mimer une exposition *in vivo*. Les concentrations en mycotoxine, non toxiques sur ce modèle cellulaire, ont été déterminées dans des études précédentes. Les IPEC-1 sont incubées pendant 1h en présence de 10 µM de DON, de 3 nM de toxine T-2 ou de DMSO à 39 °C sous une atmosphère humide et supplémentée de 5% de CO_2. A la suite de

cette incubation, le milieu de culture est éliminé et un nouveau milieu de culture sans antibiotique contenant +/- $1x10^9$ CFU/ml de *Lactobacillus sobrius* DSM 16698T est ajouté pendant 3 heures. A la fin des traitements, les cellules sont récupérées dans le but de réaliser une analyse transcriptomique.

Obtention et traitement des PBMCs

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) sont isolées à partir de sang de porc sur un gradient de ficoll-Paque (1,077 g/l, Amersham Pharmacia biotech, Uppsala, Suède). Les PBMCs sont ajustés à une concentration cellulaire de $2x10^6$ cellules/ml. Les cellules sont stimulées par la concanavaline A (ConA, 2,5 µg/ml) pendant 48h afin de détecter les LT régulateurs selon le protocole de Käser et al. (2008) (Kaser et al., 2008b). Les PBMCs sont traités pendant 48h en présence ou non de concentrations non cytotoxiques de DON (1 et 0,1 µM) ou de toxine T-2 (3 et 0,3 nM) et en présence ou non de $1x10^9$ CFU/ml de *Lactobacillus sobrius* DSM 16698T préalablement inactivés à la chaleur. Un contrôle négatif correspondant à des PBMCs non stimulés et non traités par les toxines ou les lactobacilles est également effectué lors de chaque expérience. Chacune de ces expérimentations a été réalisée en triplicat.

Extraction d'ARN et analyse transcriptomique via la qPCR

L'extraction des ARNs totaux issus des explants et des IPEC-1 est réalisée par précipitation au Trizol (Extract all, Eurobio) et à l'isopropanol. La concentration des ARNs est mesurée par Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer. La transcription inverse et la qPCR en temps réel sont effectuées comme décrit précédemment (Seeboth et al., 2013). Des échantillons d'ARN sont non rétro-transcrits dans le but de vérifier une éventuelle amplification d'ADN génomique. La spécificité des produits de PCR est évaluée en fin de réaction par l'analyse de leurs courbes de dissociation. Les amorces spécifiques des différents gènes (répertoriées dans le tableau 1) ont été achetées chez Invitrogen. L'intensité initiale de fluorescence est déterminée par la méthode des ΔCt. Chaque valeur obtenue est normalisée par deux gènes de ménage, la ribosomal protein L32 (RPL32) et la cyclophilline A. Enfin, l'expression relative des gènes est exprimée en fonction des échantillons contrôles correspondants aux

échantillons n'ayant reçu ni le traitement DON ni le traitement T-2 et n'ayant pas été exposés aux bactéries.

Tableau 1 : Liste des gènes et séquences des amorces sens (F) et anti-sens (R) utilisés pour la qPCR.

Symbole du gène	Nom du gène	Référence de la séquence	Séquences des amorces
Cyclo A	Cyclophiline A	MN_214353	F: CCCACCGTCTTCTTCGACAT R: TCTGCTGTCTTTGGAACTTTGTCT
RPL32	Ribosomal Protein L32	MN_001001636	F: AGTTCATCCGGCACCAGTCA R: GAACCTTCTCCGCACCCTGT
IL1-α	Interleukin 1 - alpha	NC_010445.3	F: TCAGCCGCCCATCCAA R : AGCCCCGGTGCCATGT
IL1-β	Interleukin 1 - beta	NM_001005149	F: GAGCTGAAGGCTCTCCACCTC R: ATCGCTGTCATCTCCTTGCAC
IL-6	Interleukin- 6	NM_214399	F: GGCAAAAGGGAAAGAATCCAG R: CGTTCTGTGACTGCAGCTTATCC
IL-8	Interleukin- 8	NM_213867	F: GCTCTCTGTGAGGCTGCAGTTC R: AAGGTGTGGAATGCGTATTTATGC
TNF-α	Tumor necrosis factor - alpha	NM_214022	F: ACTGCACTTCGAGGTTATCGG R: GGCGACGGGCTTATCTGA
IL-17A	Interleukin- 17 alpha	AB102693 (Levast et al., 2010)	F: CCAGACGGCCCTCAGATTAC R: CACTTGGCCTCCCAGATCAC
IL-21	Interleukin- 21	MN_214415 (Kiros et al., 2011)	F : GGCACAGTGCCCCATAAATC R: GCAGCAATTCAGGGTCCAAG
IL-22	Interleukin- 22	AY937228 (Levast et al.,	F: AAGCAGGTCCTGAACTTCAC R: CACCCTTAATACGGCATTGG

		2010)	
IL-23A	Interleukin- 23 alpha	(Dawson et al., 2009)	F: GAGAAGAGGGAGATGATGAGACTACA R: GGTGGATCCTTTGCAAGCA
IFN-γ	Interféron-gamma	NM_213948 (Meurens et al., 2009)	F: TGGTAGCTCTGGGAAACTGAATG R: GGCTTTGCGCTGGATCTG
TGF-β	Transforming growth factor - beta	X54859 (Levast et al., 2010)	F: GAAGCGCATCGAGGCCATTC R: GGCTCCGGTTCGACACTTTC
FoxP3	Forkhead box P3	AY669812 (Meurens et al., 2009)	F: GGTGCAGTCTCTCTGGAACAA R: GGTGCCAGTGGCTACAATAC
RALDH1	Retinoid acid lactase dehydrogenase 1	NC_010460,3 IVI suisse	F: TGGAGTGTGTGGCCAGATCA R: GCAGGCCCTATCTTCCAAATG
CCR6	Chemokine (C-C motif) receptor 6	(Dawson et al., 2009)	F: CCTGCACTGCTGCCTCAA R: TTCAGAAAGTAGCTCCGGAA
CCL20/MIP3 alpha	Chemokine (CC motif) ligand 20	NM_001024589 (Meurens et al., 2009)	F: GCTCCTGGCTGCTTTGATGTC R: CATTGGCGAGCTGCTGTGTG
CX3CL1/ Fractalkine	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	EST CK464144 (Meurens et al., 2009)	F: GCAGCTCCTAGTCCATTAC R: CACCATTCTGACCCAAAG
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin	Dawson probe	F: GCATCAGGGAGACTCCAACCT R: CTTCTCATTCCCAGTGCACATG
IgA	Imunogobulin A (heavy chain)	AB194101 (Levast et al., 2010)	F: ACCGCCACCATCACCAAACC R: AGCCATCGCACCAGCACATC
BAFF	B-cell activating Factor family	NM_001097498 (Meurens et al.,	F: GAGAGCAGCTCCATTCAAAG R: GCA TGC CAC TGT CTG CAA TC

		2009)	
IL-12p40	Interleukin 12 sub-unit 40	NM_214013	F: GGTTTCAGACCCGACGAACTCT R: CATATGGCCACAATGGGAGATG

Dosage des concentrations protéiques en TGF-beta et IL-10 par ELISA

Les concentrations en TGF-beta et en IL-10 sont mesurées par ELISA (Enzyme linked immuno-absorbent assays) en utilisant des kits spécifiques pour chaque cytokine (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Suite au coating des plaques avec les anticorps spécifiques de chaque cytokine, les plaques sont ensuite lavées avec du PBS-Tween 20 et saturées en présence de PBS-1% SVF pendant 1h à température ambiante. Les surnageants de culture d'explants sont ajoutés en duplicat et incubés pendant 2h à température ambiante. Après lavage des puits, les anticorps de détection anti-TGF-beta (clone 1D11, R&D Systems) et anti-IL-10 porcins (rpIL-10, R&D Systems) couplés à la biotine sont ajoutés. Les plaques sont incubées pendant 2h à température ambiante. Puis, un anticorps conjugué à la streptavidine-HRP (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) est ajouté pendant 30 min. Les réactions sont révélées par le 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (Thermo Fisher Scientific). La réaction est stoppée avec du H2SO4 2N et la densité optique de la réaction est lue à 450 nm.

Phénotypage des populations de cellules T regs $CD4^+$ et $CD8^+$

Le phénotypage des différentes sous-populations de Tregs obtenus à partir de PBMCs activées a été déterminé par la co-expression des marqueurs de surface CD25, CD4 et/ou CD8 associé au marquage intracellulaire FoxP3. Dans ce but, les cellules sont incubées avec l'anti-CD25 (clone K231.3B2, MCA1736, AbDSerotec), l'anti-CD4 (clone 74-12-4, VMRD) et l'anti-CD8 porcin (clone 76-2-11, VMRD). La réactivité des anticorps est révélée grâce aux anticorps secondaires anti-isotype suivants : Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG1 (Invitrogen), APC goat anti-mouse IgG2b (Southern biotech, Birmingham, USA) and PE-Cy7 goat anti-mouse IgG2a (Southern biotech). Afin de révéler le marquage intracellulaire, les cellules sont fixées puis perméabilisées avec le kit FoxP3 Staining Buffer Set (eBioscience) suivi un marquage avec l'anticorps anti-FoxP3-PE (clone FJK-16s, 0,03 µg eBioscience) (Kaser

et al., 2008b) ou avec le contrôle isotypique IgG2a couplé au PE (clone eBR2a, 0,03 µg eBioscience). Les différentes sous-populations de Tregs sont analysées par cytométrie en flux (MACSQuant analyser, Miltenyi biotech, Paris, France). Les données obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel VenturiOne (32-bit) (Miltenyi) dans le but de déterminer le pourcentage de cellules CD4+CD8-CD25+FoxP3+ (CD4+ Tregs) et CD4-CD8+CD25+FoxP3+ (CD8+Tregs) parmi la population totale de PBMCs.

Analyse de la résistance électrique (R) et de la perméabilité trans- et para-cellulaire des explants intestinaux porcins en utilisant la technique des chambres d'Ussing

Des fragments de jéjunum sont prélevés sur des porcelets âgés de 4 à 5 semaines (n=4) et sont montés en chambre d'Ussing avec une surface d'échange de 0,2 cm2. Les compartiments apicaux et basolatéraux sont baignés par 1 ml de liquide de Krebs (Sigma) supplémenté avec 2,1 g/l de NaHCO3 (Sigma), de 0,36 g/l de CaCl2-2H2O (Sigma). Les tissus sont maintenus à 37°C et sont oxygénés par du carbogène 5% CO_2/95% O_2. La résistance électrique est mesurée comme un index de l'intégrité du tissu. De plus, la perméabilité transcellulaire et paracellulaire est évaluée à l'aide respectivement de la HRP 40 kDa (Sigma) et du FITC-dextran 4kDa (Sigma).

L'effet des lactobacilles sur la perméabilité trans- et para-cellulaire a été évalué à travers deux expériences l'une *ex vivo* et l'autre *in vivo*. Lors de l'expérience ex vivo, les explants jéjunaux ont été prélevés sur six individus sains et ont été pré-exposés 1h apicalement avec du DON (10 µM) avant l'ajout de *L. sobrius* (1 x 10^9 CFU/ml) pendant 3h. Lors de l'expérimentation *in vivo*, des porcelets sevrés à 28 jours ont été gavés (groupe DON, n=4) ou non (groupe contrôle, n=4) par voie orale pendant 14 jours avec 0,3 mg de DON/kg de poids vif/jour (8 ppm) (n° saisine : TOXCOM/0004/IO AMC). La solution de gavage contenait la toxine dissous dans ¾ d'eau et ¼ de jus de cassis. Après abattage des animaux, des explants jéjunaux d'animaux sains et d'animaux gavés au DON ont été prélevés et ont été placés en chambres d'Ussing comme précédemment décrit. *L. sobrius* (1x10^9 CFU/ml) a été ajouté dans les chambres apicalement pendant 3h.

Statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 4. Les résultats sont exprimés par la moyenne +/- SEM. La comparaison entre les groupes a été effectuée grâce à un test non paramétrique (Test de Mann Withney). Les différences sont considérées comme statistiquement significatives lorsque la p-value est inférieure à 0,05.

Résultats

L. sobrius ne permet pas de réduire la réponse inflammatoire innée induite par le DON ou la toxine T-2

Cette équipe a précédemment montré que le DON comme la toxine T-2 sont à l'origine d'une réponse inflammatoire innée au niveau intestinal (Seeboth et al, en préparation). Nous avons testé le potentiel effet protecteur de la souche commensale *Lactobacillus sobrius* 16698T sur l'initiation de cette inflammation. Dans ce but, nous avons pré-exposé des explants de jéjunum à 10 µM de DON ou à 3 nM de T-2 pendant 1h, retiré les toxines du milieu puis à nouveau, exposé les explants à *L. sobrius* 16698T pendant 3h. Conformément à nos résultats précédents, en absence de *L. sobrius* 16698T, le DON induit significativement l'expression des gènes pro-inflammatoires IL-1α (2,24 +/-0,23), IL-1β (5,96 +/-1,36) et IL-8 (6,32 +/- 2,11). La toxine T-2, quant à elle, induit significativement l'expression des gènes IL-1α (2,18 +/- 0,10), IL-1β (3,51 +/- 0,62) et TNF-α (5,59 +/- 0,66) (figure 1). De plus, il est à noter que l'exposition d'explants intestinaux à *L. sobrius* n'induit pas d'inflammation. Ces deux observations nous ont permis de valider ce modèle expérimental et ainsi d'évaluer l'effet protecteur potentiel de cette souche bactérienne sur l'initiation de l'inflammation innée par les toxines. Que ce soit lors d'une pré-exposition au DON ou à la T-2, nous n'avons pas observé de changement d'expression des gènes IL-1, TNF-α ou IL-8 en présence de L. sobrius 16698T. Ainsi, *L. sobrius* ne semble pas diminuer l'inflammation innée générée par une pré-exposition d'explants de jéjunum aux toxines.

***L. sobrius* ne permet pas de réduire la réponse Th1 induite par les toxines mais potentialise la réponse IFN-γ produite par la toxine T-2.** Nous avons cherché à caractériser l'impact de cette bactérie sur la voie Th1 à travers la modulation de l'expression de l'IFN-γ et de l'IL-

12p40 en utilisant le modèle *ex vivo* des explants jéjunaux (figure 2). De façon intéressante, nous observons une diminution significative de l'expression de l'IFN-γ en présence de lactobacilles, qui n'est pas observé au niveau du gène Il-12. De plus, les résultats montrent une augmentation significative de l'expression de l'IFN-γ en présence de la toxine T-2 alors que seul l'IL-12 est augmentée de façon significative suite à une incubation avec le DON. L. sobrius, sur un tissu pré-exposé à la toxine T-2 augmente de façon significative l'expression de l'IFN-γ phénomène non observé après une pré-exposition au DON. .

***L. sobrius* diminue de façon toxine-dépendante l'expression des cytokines impliquées dans la voie inflammatoire IL-17**

Nous nous sommes intéressés également à l'impact de *L. sobrius* sur la voie T régulatrice et la voie inflammatoire IL-17, décrites pour être modulées par ces deux mycotoxines (Seeboth et al., en préparation). A travers une approche transcriptomique, nous avons étudié l'expression des gènes des cytokines impliquées dans la voie inflammatoire IL-17. Comme précédemment décrit par cette équipe, le DON et la toxine T-2 induisent significativement l'ensemble des gènes testés (IL-6, IL-22, IL-17A et IL-23A). De façon intéressante, la seule présence de *L. sobrius*, sans addition de toxines, induit une diminution significative de l'expression des gènes IL-17A (0,29 +/- 0,17), IL-23A (0,06 +/- 0,009) et IL-21 (0,3 +/- 0,14) par rapport au groupe contrôle. De plus, nous avons observé une diminution drastique de l'expression de l'ensemble de ces gènes en présence de *L. sobrius* uniquement en présence de DON atténuant complètement l'induction de l'inflammation de type IL-17 initiée par cette toxine. La présence de *L. sobrius* 16698T réduit par exemple l'expression de l'IL-23A d'un facteur 7 et l'expression de l'IL-17A d'un facteur 4, leur niveau d'expression revenant aux valeurs contrôles sans toxine (Figure 3). En revanche, dans le cas d'une pré-exposition à la toxine T-2, aucun effet de la souche *L. sobrius* 16698T n'a été mis en évidence sur cette voie inflammatoire..

***L. sobrius* n'agit pas sur la voie T régulatrice**

Les données obtenues récemment par l'équipe ont pu mettre en évidence que seul le DON et non la toxine T-2 diminue de façon significative l'expression des gènes RALDH et FoxP3, impliqués respectivement dans la différenciation et le maintien de la fonction régulatrice des

lymphocytes T. Cependant, ces deux trichothécènes ont la capacité de diminuer de façon significative les différentes sous-populations de cellules Tregs (Seeboth et al, en préparation). Nous avons émis l'hypothèse que l'effet bénéfique des Lactobacilles sur la voie IL-17 pourrait être dû à une stimulation de la différenciation des Tregs par les lactobacilles qui pourrait être plus favorable en présence de DON qu'en présence de toxine T-2. Nous avons ainsi étudié l'effet de *L. sobrius* DSM 16698T sur cette voie à travers l'expression des gènes de divers facteurs impliqués dans la différenciation des Th naïves en Tregs (TGF-β, IL-10, RALDH, FoxP3) (Figure 4A) et l'expression protéique des cytokines TGF-β et IL-10 (figure 4B). Nos résultats montrent que *L. sobrius* appliqué sur des tissus sains non exposés aux toxines et ne module pas l'expression des gènes FoxP3 et RALDH. Comme attendu et décrit dans nos travaux précédents, seul le DON contrairement à la toxine T-2, induit une diminution significative de l'expression des gènes RALDH (0,21 +/- 0,03) et FoxP3 (0,36 +/-0,09). Cependant, nous avons montré précédemment que même si la toxine T-2 n'induit pas de diminution significative des gènes FoxP3 et RALDH, elle est néanmoins à l'origine d'une diminution significative des sous-populations des cellules Tregs $CD4^+$ et $CD8^+$ (Seeboth et al, en préparation). En présence de DON comme de T-2, la présence de *L. sobrius* ne modifie ni l'expression de TGF-β ni l'expression d'IL-10. En revanche, uniquement dans le cadre d'une exposition au DON, la présence de cette bactérie renforce la diminution de l'expression des gènes RALDH et FoxP3 (Figure 4A). Deuxièmement, *L. sobrius* DSM 16698T n'induit pas l'expression des deux protéines IL-10 et TGF-β (Figure 4B). Nous avons également analysé l'impact de *L. sobrius* sur ces différentes sous-populations après pré-exposition au DON ou à la toxine T-2 (figure 4C). En absence de *L. sobrius*, nous observons une diminution significative des populations $CD4^+$Tregs et $CD8^+$Tregs (réduction des $CD4^+$Tregs d'un facteur 3 et d'un facteur 4 ou 7,5 pour les $CD8^+$Tregs suite à une exposition de 1 µM de DON ou de 3 nM de toxine T-2, respectivement). La présence de *L. sobrius* ne permet pas de restaurer la fréquence des $CD4^+$ Tregs, ni des $CD8^+$ Tregs. Ainsi la présence de *L. sobrius* ne permet pas de diminuer l'impact des toxines DON et T-2 sur les populations T régulatrices. Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence que le mécanisme d'action bénéfique de *L. sobrius* 16698T sur la réponse inflammatoire de type IL-17 n'implique pas la voie T régulatrice.

***L. sobrius*, dans le cas d'une pré-exposition au DON, diminue le recrutement immunitaire induit par les cellules IPEC-1**

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action des Lactobacilles lesquels s'avèrent avoir un effet toxine-dépendant sur la voie inflammatoire IL-17, nous avons choisi de tester cette souche sur un modèle *in vitro* de cellules épithéliales intestinales de porc (IPEC-1). En effet, moins complexe que les explants qui font intervenir l'ensemble des acteurs immunitaires de la *lamina propria*, les IECs ont la capacité de moduler et d'orienter les réponses immunitaires. Précédemment, nous avons montré que le DON contrairement à la toxine T-2 a la capacité d'induire le recrutement immunitaire. Nous nous sommes alors proposé d'étudier l'effet de ce Lactobacille sur l'ensemble des fonctions immunitaires qui peuvent être modulées par les IECs.

En réponse à une agression, les IECs ont la capacité d'initier une inflammation innée. Nous avons évalué l'effet de *L. sobrius* sur les gènes pro-inflammatoires IL-1α, TNF-α et IL-8 (figure 5A). En accord avec les données de la littérature, nos résultats montrent qu'une exposition au DON ou à la toxine T-2 induit l'augmentation significative de l'expression des gènes IL-1α (2,85 et 1,80 respectivement), TNF-α (4,28 et 1,73 respectivement) et IL-8 (25,74 et 2,68 respectivement). De façon intéressante, la présence de *L. sobrius* DSM 16698T engendre une augmentation significative de l'ensemble des gènes inflammatoires témoignant de la mise en place d'une inflammation par les IECs, inflammation qui n'avait pas été observé après incubation des explants avec le Lactobacille. Nous nous sommes également intéressés à la capacité des IECs à moduler la réponse humorale et notamment la réponse des IgA en étudiant la modulation de l'expression des gènes IgA, TSLP et BAFF (figure 5B). L'analyse transcriptomique des gènes TSLP et IgA n'a pas révélé d'effet des toxines ou des Lactobacilles. En revanche, la présence de *L. sobrius* induit une diminution significative de 50% par rapport au contrôle de l'expression BAFF (0,49 +/- 0,07). Cette diminution significative en présence de Lactobacilles a été observée aussi bien dans le groupe contrôle que dans les groupes DON (0,46 +/- 0,08) et T-2 (0,49 +/- 0,06).

Participant également à la différenciation des cellules Th naïves en Tregs, nous avons évalué l'impact de *L. sobrius* sur la capacité des IECs à moduler cette voie de différenciation suite à une pré-exposition au DON ou à la T-2 à travers l'analyse transcriptionnelle des gènes TGF-β et RALDH (figure 5C). Les toxines n'ont pas d'effet sur l'expression de RALDH par les IECs. En

revanche, de façon étonnante, la seule présence de *L. sobrius* induit de manière significative l'expression de TGF-β par les IPEC-1 quelque soit le groupe expérimental : contrôle (2,26 +/- 0,40), DON (2,26 +/- 0,43) et T-2 (2,12 +/- 0,29).

De plus, ces résultats montrent qu'en absence de *L. sobrius* une exposition à la toxine T-2 et au DON induit une diminution significative de l'expression de CX3CL1 (0,18 +/- 0,09 vs 0,11 +/- 0,04) (figure 5D), cytokine impliquée dans le recrutement des cellules immunitaires, notamment des macrophages et des cellules dendritiques. Cette diminution est indépendante du traitement par les toxines, en effet en présence de *L. sobrius*, les valeurs sont diminuées respectivement : contrôle (0,05 +/- 0,009), DON (0,08 +/- 0,004) et T-2 (0,16 +/- 0,02). De façon intéressante, *L. sobrius* à la capacité de diminuer l'expression du gène CCL20, seulement dans le cas d'une pré-exposition des cellules IPECs au DON (diminution significative d'un facteur de 2) (figure 5D).

L'ensemble des effets observés suite à une incubation des cellules épithéliales intestinales avec *L. sobrius* (qu'ils soient de nature inflammatoire, liés à la réponse humorale ou régulatrice), ne sont pas affectés par une exposition préalable des cellules aux toxines. Les résultats obtenus sur ce modèle cellulaire permettent de conclure à une action spécifique de *L. sobrius* DSM 16698T dans le cas d'une pré-incubation au DON, sur le recrutement cellulaire à travers la diminution de l'expression de CCL20. Cette action semble toxine-dépendante.

L. sobrius DSM 16698T restaure la diminution de la résistance électrique (R) et de la perméabilité transcellulaire, induite par une pré-exposition au DON

En se basant sur les résultats précédents montrant un effet des Lactobacillus essentiellement lors qu'une pré-incubation par le DON et son action délétère sur la fonction de barrière étant antérieurement montré, nous avons analysé effet des Lactobacilles sur l'intégrité de cette barrière dans le cas d'une pré-incubation à cette toxine. Pour répondre à cette question, la résistance électrique et la perméabilité para- et trans-cellulaires (FITC-dextran et HRP) ont été évaluées après exposition *ex vivo* d'explants jéjunaux au DON (figure 6A) ou lors d'une expérimentation *in vivo* après ingestion par les animaux de DON (0,3 mg/kg de poids vif /j) pendant 14 jours (figure 6B). Nous observons une diminution de la R dès 30 minutes après exposition apicale *ex vivo* des explants jéjunaux avec le DON. Cette

diminution significative de la R est aussi observée sur des explants d'animaux ayant ingérés du DON, comparée aux animaux contrôles. Il est important de noter que nous observons une augmentation significative de la R après 180 min d'incubation en présence de *L. sobrius* sur des explants d'animaux ayant ingérés du DON (figure 6B) montrant l'effet bénéfique de cette bactérie sur l'épithélium intestinal.

En parallèle, la perméabilité intestinale paracellulaire au FITC-dextran 4KDa et transcellulaire à la HRP-intacte ont été mesuré. Il est à noter que nous avons obtenu des résultats similaires suite à l'exposition *ex vivo* ou *in vivo* au DON. La perméabilité paracellulaire n'est pas modifiée par une exposition au DON en présence ou non de *L. sobrius*. En revanche, la perméabilité transcellulaire est significativement diminuée en présence de DON après une exposition *ex vivo* (0,019 +/- 0,012) ou *in vivo* (0,08 +/- 0,006). De façon intéressante, *L. sobrius* restaure la diminution de la perméabilité transcellulaire induite par une pré-exposition *ex vivo* de DON. Bien que cette restauration ne semble que partielle dans le cas d'une exposition *in vivo* au DON, la perméabilité transcellulaire à la HRP est cependant augmentée (p value = 0,057).

L'ensemble de ces résultats a permis de mettre en évidence un effet protecteur de *L. sobrius* sur les fonctions de barrière intestinale notamment contre les effets délétères du DON sur des tissus suite à une exposition *ex vivo* ou *in vivo* à cette toxine.

Discussion

En conséquence des préjudices sanitaires et des pertes économiques provoquées par la présence de trichothécènes (DON et toxine T-2), de nombreuses stratégies ont été développées pour lutter contre leurs présences et/ou leurs toxicités (AFSSA, 2009; CAST, 2003; Pedrosa et al., 2010). Le DON et la toxine T-2 sont connus pour être immunotoxiques, ciblant majoritairement les cellules immunitaires (Bimczok et al., 2007; Hymery et al., 2009; Nagata et al., 2001; Pestka and Zhou, 2006; Seeboth et al., 2012) et les fonctions de la barrière intestinale (Goossens et al., 2012; Pinton et al., 2011; Pinton et al., 2009). Les cellules immunocompétentes présentes au sein des tissus lymphoïdes associés à l'intestin sont les principales cibles de ces toxines. L'équipe a récemment montré qu'une exposition d'explants de jéjunum au DON ou à la toxine T-2 perturbe l'homéostasie intestinale en influençant la voie inflammatoire IL-17 et la voie T régulatrice (Seeboth et al., 2013) (Seeboth

et al., en préparation). L'une des méthodes d'élimination des mycotoxines dite méthode microbiologique consiste à évaluer l'effet de souches bactériennes commensales telles que les Lactobacilles ou les Bifidobactéries sur les effets toxiques des mycotoxines. L'objectif de cette étude était d'évaluer *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*, l'effet de la souche *L. sobrius* en réponse à une exposition au DON ou à la toxine T-2 sur les réponses immunitaires initiées dans la *lamina propria* d'une part et sur les fonctions de barrière intestinale d'autre part.

Dans cette étude, nous avons analysé l'effet bénéfique de la souche *L. sobrius* DSM 16698T sur l'altération de la barrière intestinale induite par une pré-exposition au DON et à la toxine T-2. Nous nous sommes intéressés à la barrière immunologique mais aussi à la barrière physique (épithélium intestinal).

De nombreuses souches de bactéries commensales ont montré des effets immuno-modulateurs bénéfiques pour l'hôte en réponse soit à des bactéries pathogènes (Karunasena et al., 2013; Lievin-Le Moal et al., 2002; Naaber et al., 2004; Roselli et al., 2007) soit à des toxines, notamment au niveau de la réponse pro-inflammatoire. C'est le cas des mycotoxines (Hathout et al., 2011; Mechoud et al., 2012). Ainsi, Mechoud et al. (2012) montre que *L. reuteri* CRL 1098 et *L. acidophilus* CRL 1014 permettent de réduire *in vitro* l'induction de l'expression de la cytokine pro-inflammatoire TNF-α par l'ochratoxine A (Mechoud et al., 2012). En accord avec les données de la littérature, nos résultats montrent que les trichothécènes sont capables d'induire de façon significative l'expression des gènes pro-inflammatoires TNF-α, IL-1 et IL-8 aussi bien sur un modèle *ex vivo* d'explant intestinaux qu'*in vitro* sur des cellules IPEC-1. En revanche, *L. sobrius* s'est révélée dans l'incapacité de réduire l'induction de l'expression des cytokines TNF-α, IL-1 et IL-8. Les cellules épithéliales intestinales sont les premières cellules au contact des contaminants alimentaires, elles sont ainsi en contact direct avec les mycotoxines et les bactéries commensales. En effet, ces cellules possèdent à leurs surfaces des récepteurs, notamment les récepteurs Toll-like (TLRs). Les TLR-2 et -6 sont capables de reconnaître de nombreux motifs bactériens notamment les acides lipotéichoïques (LTA) et les acides téichoïques (WTA) de la paroi des bactéries qu'elles soient pathogènes ou commensales (Alves et al., 2007; Navarre and Schneewind, 1999). La reconnaissance des TLRs avec leurs ligands spécifiques active alors les voies de signalisation des TLRs aboutissant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF, IL-8) (Akira, 2006; Kawai and Akira, 2009). Par exemple, les LTA sont décrits comme un des éléments de

la paroi des bactéries Gram+ le plus immuno-modulateur (Grangette et al., 2005; Huang et al., 2007). En revanche, à la différence des travaux de Roselli et al. (2007), les résultats de cette présente étude ont montré sur un modèle d'IPEC que la seule présence de *L. sobrius* DSM 16698T induit une immuno-stimulation de la réponse pro-inflammatoire (IL-1α, TNF-α, IL-8) et des réponses régulatrices TGF-β. Ainsi, l'augmentation de ces gènes peut être associée à la mise en place par la bactérie d'une immuno-régulation résiduelle au niveau intestinal permettant de maintenir un état d'homéostasie (Dietert, 2012). Mais cette divergence peut être également expliquée par un temps d'incubation différent (Roselli et al., 2007). De plus, contrairement aux données publiées par ces auteurs, nos résultats ne montrent pas de modulation par la souche *L. sobrius* sur cette réponse inflammatoire induite par les mycotoxines. Cette différence peut être imputée à la nature de l'agression (toxines versus agents bactériens pathogènes). Nous avons également noté que si *L. sobrius* induit une inflammation sur un modèle IPEC-1, cette induction n'est pas observée dans le modèle d'explant suggérant qu'au sein de ce dernier, le dialogue cellulaire et cytokinique permet de réguler l'inflammation résiduelle générée par *L. sobrius.*

Ces deux trichothécènes exacerbent la réponse inflammatoire IL-17 et les cytokines associées tels que IL-17, IL-23, IL-22, IL-6 (Seeboth et al., 2013) (Seeboth et al., en préparation). Cette présente étude nous a permis de mettre en évidence de façon très intéressante un effet bénéfique de la souche *L. sobrius* DSM 16698T sur la réponse inflammatoire de type IL-17 à travers la diminution de l'expression des gènes des cytokines IL-17, IL-6, IL-22, IL-23 seulement lors d'une pré-exposition au DON. D'autres auteurs ont également montré l'effet suppressif de certaines souches de Lactobacillus sur l'inflammation IL-17. En effet, Chiba et al. (2010) montrent que *L. casei* inhibe significativement la sécrétion d'IL-17 induite par une stimulation antigénique sans changer la proportion de cellules Th17 (Chiba et al., 2010). De plus, l'équipe de Jan et al. (2011) observe que *L. gasseri* diminue la sécrétion d'IL-17A induite par le TGF-β et l'IL-6 sur des splénocytes. Cette souche bactérienne diminue également le nombre de macrophages alvéolaires producteurs d'IL-17 suite à une administration orale de *L. gasseri* (Jan et al., 2011). De façon surprenante, nos résultats montrent que la souche *L. sobrius* n'a pas d'effet sur l'inflammation IL-17 lorsque celle-ci est induite par une pré-exposition à la toxine T-2. Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette différence. Premièrement, cette divergence peut être imputée

par l'induction d'un profil cytokinique différent par le DON ou la toxine T-2. En effet, nos résultats montrent que la toxine T-2 induit une expression nettement supérieure d'IL-21, d'IL-22 et d'IL-23A et d'IFN-γ par rapport au DON. De plus, il est envisageable de penser que du fait de l'ampleur de l'induction, *L. sobrius* n'est pas en mesure de contrôler la réponse immunitaire mise en place par la toxine T-2, hypothèse qui confirmerait également que la toxine T-2 est la plus immuno-toxique des toxines du groupe des trichothécènes (AFSSA, 2009; Meissonnier et al., 2008). Deuxièmement, il a été récemment montré que différents types cellulaires tels que les macrophages, ILCs, Th17 mais également d'autres lymphocytes T producteurs d'IL-17 comprenant les lymphocytes $TCD8^+$, les iNKT et les cellules Tγδ possédaient également la capacité de sécréter de l'IL-17 et les cytokines associées tels que IL-21 et IL-23 (Kim and Jordan, 2012; Roark et al., 2008; Spits and Di Santo, 2010; Sutton et al., 2009; Sutton et al., 2012). De plus, nous avons montré dans une étude précédente que, suite à une exposition au DON et à la toxine T-2, l'IL-17 était produite principalement par les cellules $T\gamma\delta^+IL17^+$ (Seeboth et al., en préparation). Ainsi, la différence dans le niveau d'induction de l'expression des gènes de cette voie IL-17 entre le DON et la toxine T-2 pourrait être due à une cible cellulaire productrice d'IL-17 différente et spécifique de chaque toxine. En suivant cette hypothèse, la souche bactérienne *L. sobrius* pourrait avoir une action préférentielle sur la réponse des cellules $T\gamma\delta^+IL17^+$ induit par le DON et pas sur un autre type cellulaire préférentiellement induite par la toxine T-2. Cette hypothèse peut être mis en relation avec nos résultats montrant que la présence de DON induit une fréquence deux fois plus élevée de cellules $T\gamma\delta^+IL17^+$ par rapport à la toxine T-2 (Seeboth et al., en préparation). Afin de mieux comprendre cette différence de réponse, il serait intéressant dans la suite de ce travail, de phénotyper de façon plus précise les sous-populations cellulaires cibles de ces deux mycotoxines capables de produire les cytokines inflammatoires de type IL-17.

De plus, nos résultats montrent que *L. sobrius* induit une diminution de l'expression du gène CCL20 dans les cellules IPEC-1, gène augmenté seulement en présence de DON. Ces résultats peuvent signifier une diminution du recrutement des cellules exprimant le CCR6, notamment les cellules dendritiques mais également les cellules $T\gamma\delta^+IL17^+$. Ce résultat permet d'expliquer la diminution de l'expression de la voie IL-17 en présence de Lactobacilles suite à une pré-exposition au DON.

Comme décrit dans la littérature, la fonction immunitaire n'est pas la seule fonction qui est altérée par la présence de mycotoxines. Le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale est fondamental pour prévenir des infections bactériennes impliquées de façon conséquente dans le développement des maladies inflammatoires intestinales (Fasano and Shea-Donohue, 2005; Seeboth et al., 2013). Cette barrière intestinale compte en première ligne les IECs constituant une barrière physique contre la plupart des contaminants alimentaires (pathogènes ou toxines) grâce à leurs jonctions serrées intercellulaires empêchant la diffusion de molécules et de pathogènes et le rôle du mucus contenant des peptides anti-microbiens, des molécules cytoprotectives et les IgA sécrétoires capables de protéger la surface de l'épithélium en assurant la capture et l'élimination des microorganismes sécrétoires. Au cours de cette étude, nous avons évalué sur un modèle *in vitro* d'IEC (cellules IPEC-1), les effets de la souche *L. sobrius* sur les réponses IgA mais également son impact sur la perméabilité de cette barrière à travers les passages para- et transcellulaires. Ainsi, nous n'avons pas observé d'effet des toxines (DON et toxine T-2) ou de *L. sobrius* sur la réponse IgA ou sur la réponse humorale (TSLP) suggérant que ni le DON ni la toxine T-2 ni même ce Lactobacillus n'initient pas de façon préférentiel les réponses IgA ou humorales. Cependant, plusieurs études ont caractérisé l'effet du DON et de la toxine T-2 sur la fonction de barrière des IECs. En effet, le DON et la toxine T-2 augmentent la perméabilité intestinale et permettent ainsi le passage de différents composés tels que les antibiotiques (Goossens et al., 2012) ou l'entrée des bactéries pathogènes (Vandenbroucke et al., 2011). Elles perturbent également l'absorption des nutriments (Maresca et al., 2002). Conformément à ce qui a été décrit dans la littérature, nous avons également observé que le DON altère la perméabilité de la barrière intestinale (Goossens et al., 2012; Pinton et al., 2009; Pinton et al., 2012b). Les jonctions serrées jouent un rôle fondamental dans le maintien de l'intégrité de la barrière et de ses fonctions via l'interaction des protéines ZO avec les protéines transmembranaires occludines et claudines (Berkes et al., 2003; Furuse et al., 1994; Pinton et al., 2010; Tsukita et al., 2001). Ainsi, Pinton et al. (2009 ; 2010) montrent que le DON affecte les fonctions de barrière épithéliale en diminuant l'expression de la claudine-4 à travers un mécanisme dépendant de la voie des MAP kinases (Pinton et al., 2010; Pinton et al., 2009). De même Roselli et al. (2007) montrent que d'autres contaminants alimentaires tels que des bactéries pathogènes, les *enterotoxigenic Escherichia*

coli ou ETEC affaiblissent également la barrière intestinale en réduisant l'expression des protéines de jonctions (ZO-1 et occludine) et des protéines du cytosquelette (actine F) (Roselli et al., 2007), de façon similaire au mécanisme d'action du DON décrit par Pinton et al. (2009 ; 2010) (Pinton et al., 2010; Pinton et al., 2009). Les résultats de cette présente étude montrent un effet bénéfique de la souche *L. sobrius* DSM 16698T sur l'altération des fonctions de barrière induite par le DON (diminution de la perméabilité intestinale). Roselli et al. (2007) ont également montré la capacité de la souche *L. sobrius* DSM 16698T à contrecarrer les effets d'une perturbation induite par les ETEC au niveau de la barrière intestinale en inhibant complètement les effets des bactéries pathogènes sur l'expression de ZO-1 et des occludines (Roselli et al., 2007). Ainsi, nos résultats suggèrent qu'en plus d'agir sur les fonctions immunitaires, la souche *L. sobrius* DSM 16698T pourrait agir également sur l'expression des protéines de jonctions telles que ZO-1, occludines ou claudines dont l'expression aurait été perturbée par une exposition au DON. Cette hypothèse mériterait cependant d'être analysée dans une étude ultérieure. Par ailleurs, l'effet de *L. sobrius* DSM 16698T sur l'intégrité de la barrière n'est pas un cas isolé et l'évaluation *in vitro* du potentiel probiotique de *L. salivarius* SMXD51 contre une infection par *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 a également montré leur effet sur l'augmentation de la résistance trans-épithéliale (TEER) et un renforcement du cytosquelette d'actine F (Messaoudi et al., 2012).

Le transport des molécules de la lumière intestinale vers la *lamina propria* emprunte deux voies différents : la diffusion paracellulaire à travers les jonctions serrées entre les IECS et le transport transcellulaire impliquant les mécanismes d'endocytose/exocytose ou les récepteurs membranaires (Menard et al., 2010). Dans cette étude, nous n'avons pas observé de modification de la perméabilité paracellulaire en réponse au DON sur un modèle *ex vivo* d'explant contrairement à ce qui est décrit dans la littérature. En effet, Pinton et al. (2009) montrent une augmentation significative du flux paracellulaire aussi bien sur des modèles *cellulaires in vitro* d'IPEC-1 ou de Caco2 (Pinton et al., 2009) en contact avec des doses de 20 µM de DON. La présence de 10 µM de DON n'affectant pas significativement le passage paracellulaire. Cependant, de façon intéressante, nous avons observé que le DON diminue la perméabilité transcellulaire à la HRP sous forme intacte laquelle est restaurée par la présence de Lactobacilles. Les effets du DON sur le passage transcellulaire que nous observons pourraient être du à une dégradation plus importante de la HRP au niveau du

lysosome. En effet, en conditions physiologiques, seul 10% des antigènes empruntant cette voie de transcytose sont retrouvés intacts dans la partie basale alors que 90% sont sous forme dégradés. Cependant, cette hypothèse demande des investigations supplémentaires notamment pour mieux comprendre comment le DON pourrait activer la voie de dégradation lysosomale. De plus, une analyse de la perméabilité transcellulaire de la HRP dégradée pourrait permettre de mieux comprendre l'action de cette mycotoxine sur la transcytose et le mode d'action des Lactobacilles.

Enfin cette étude suggère que l'effet protecteur de *L. sobrius* sur la barrière intestinale ne dépend pas de sa capacité à lier les mycotoxines mais d'un effet propre sur la fonction de barrière. En effet, l'effet protecteur est observé en contact directe avec le DON (explants traités *ex vivo*) et en absence de DON (porcs traités *in vivo*). Ce résultat souligne l'importance des bactéries commensales au sein du tractus gastro-intestinal dans la réponse aux contaminants alimentaires. En effet, leur mécanisme d'action est encore mal connu mais celles-ci peuvent intervenir dans divers mécanismes tels que la colonisation de l'intestin prévenant de l'adhésion des bactéries pathogènes, dans la production de produits du métabolisme (acides lactiques) ou d'antibiotiques naturels inhibant la croissance des bactéries indésirables ou encore dans la stimulation des mécanismes de défenses améliorant l'immunité de l'hôte (Lessard, 2004).

Dans cette étude, nous montrons que *L. sobrius* peut influencer les réponses immunitaires non seulement à travers la modulation de réponses immunitaires (voie IL-17 et Tregs) mais également à travers le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale (augmentation de la R). Dans le cas d'une pré-exposition au DON, cette étude montre la capacité de *L. sobrius* à réduire l'induction de la voie inflammatoire IL-17 tout comme sa capacité à rétablir les paramètres impliqués dans les fonctions de la barrière intestinale (R et passage transcellulaire). De par sa capacité à stimuler l'immunité et à renforcer les fonctions de barrière au niveau intestinal, *L. sobrius* DSM 16698T semble être un candidat potentiel pour contrecarrer les effets négatifs de certaines mycotoxines, notamment du DON, chez le porc. Cependant, d'autres d'études doivent être conduites afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu par ces Lactobacilles et ainsi, permettre d'étendre leur action vis-à-vis d'autres types de mycotoxines ou de contaminants alimentaires.

Figures et légendes

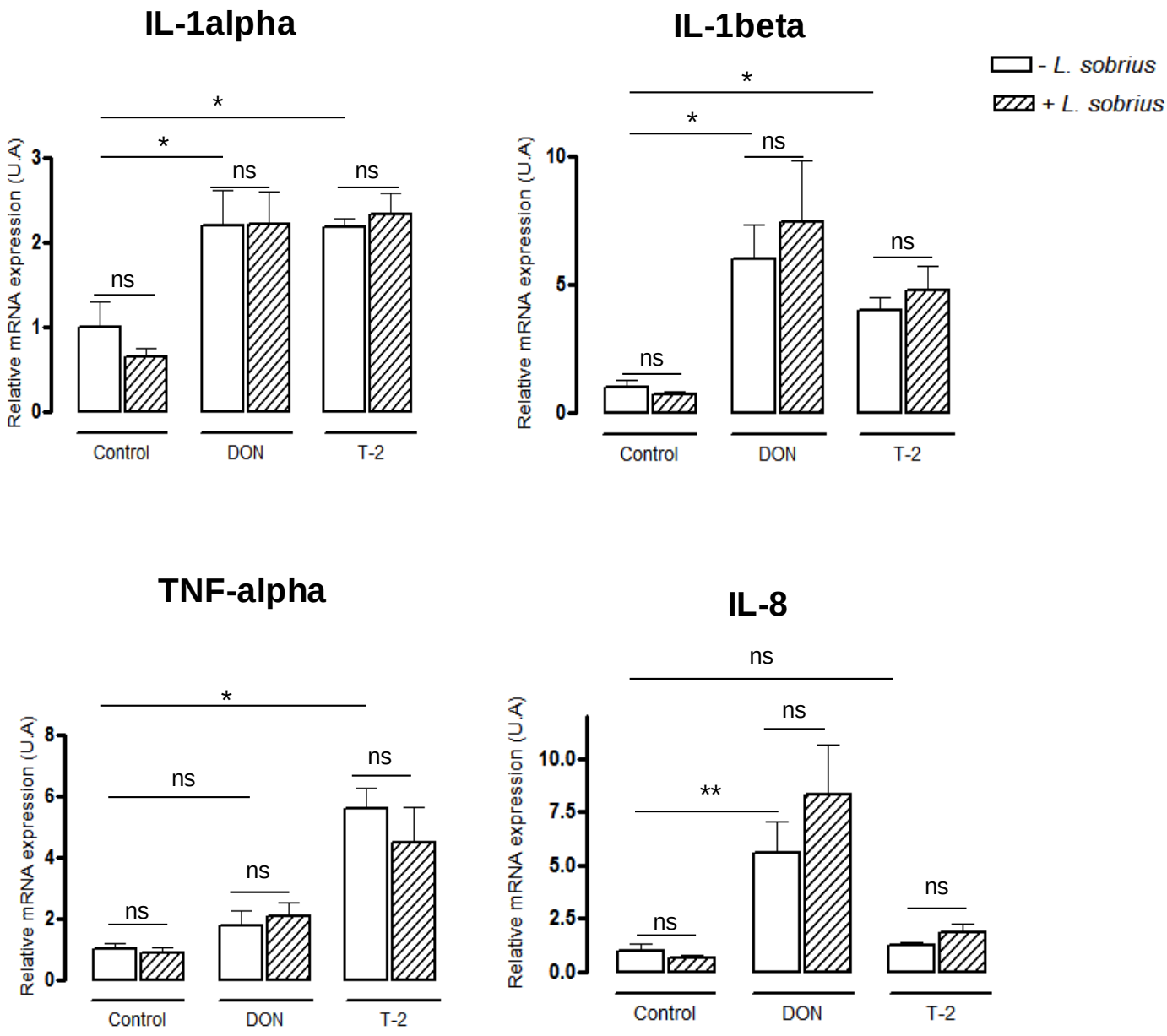


Figure 1

Figure 1 : Modulation de la réponse pro-inflammatoire par *Lactobacillus sobrius* sur un modèle *ex vivo* d'explants intestinaux pré-traités avec les mycotoxines DON ou T-2. Les explants intestinaux de porc sont mis en culture en présence de 10 µM de DON ou de 3 nM de toxine T-2 pendant 1h. A la suite de cette incubation, le milieu de culture est échangé par du milieu de culture sans toxine puis les explants sont incubés pendant 3h en absence L. *sobrius* (histogrammes blancs) ou en présence de $1x10^9$ CFU/ml de *L. sobrius* (histogrammes hachurés). L'expression des gènes (IL-1alpha et beta, TNF-alpha et IL-8) a été analysée par RT-qPCR. Les résultats sont normalisés par deux gènes de ménage (Cyclophilin A and RPL32). Les données représentent les valeurs moyennes +/- SEM obtenues à partir de six animaux différents. Les valeurs d'expression des gènes sont exprimées en fonction du groupe contrôle. Les astérisques indiquent les différences significatives * $P < 0,05$ et **$P < 0,01$.

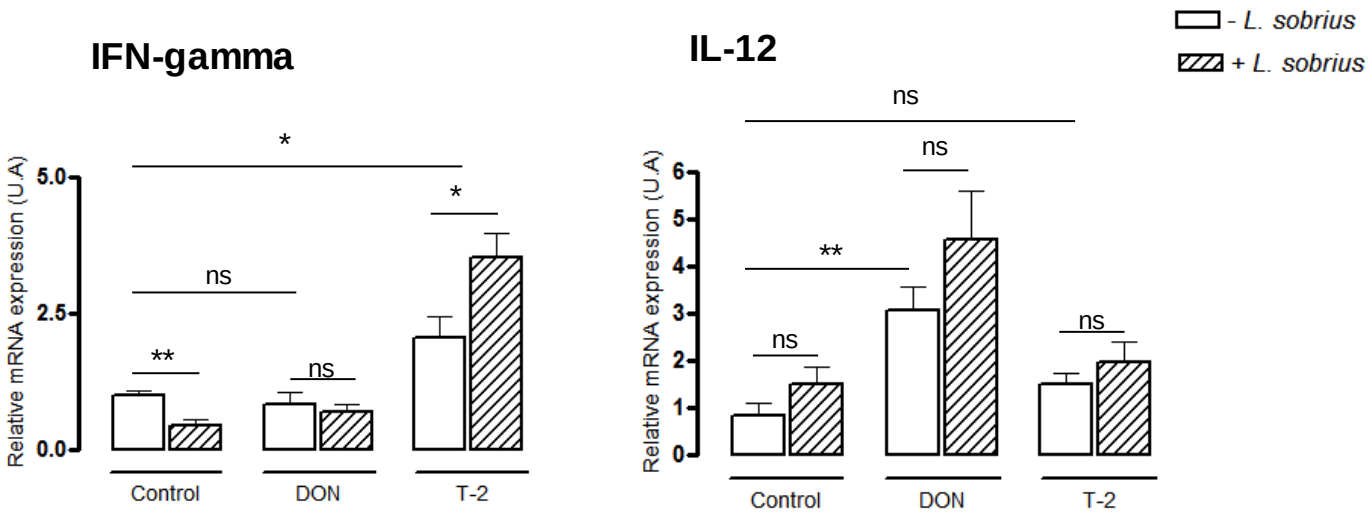


Figure 2: Modulation de la réponse Th1 par *Lactobacillus sobrius* sur un modèle *ex vivo* d'explants intestinaux pré-traités avec les mycotoxines DON ou T-2. Les explants intestinaux de porc sont mis en culture en présence de 10 µM de DON ou de 3 nM de toxine T-2 pendant 1h. A la suite de cette incubation, le milieu est éliminé et les cellules sont incubées pendant 3h sans (histogrammes blancs) ou en présence de $1x10^9$ CFU/ml de *L. sobrius* (histogrammes hachurés). L'expression des gènes (IFN-gamma et IL-12) est analysée par RT-qPCR. Les résultats sont normalisés par deux gènes de ménages (Cyclophilin A and RPL32). Les données représentent les valeurs moyennes +/- SEM obtenues à partir de six animaux différents. Les valeurs d'expression des gènes sont exprimées de façon relative au groupe contrôle. Les astérisques indiquent les différences significatives * $P < 0,05$ et **$P < 0,01$.

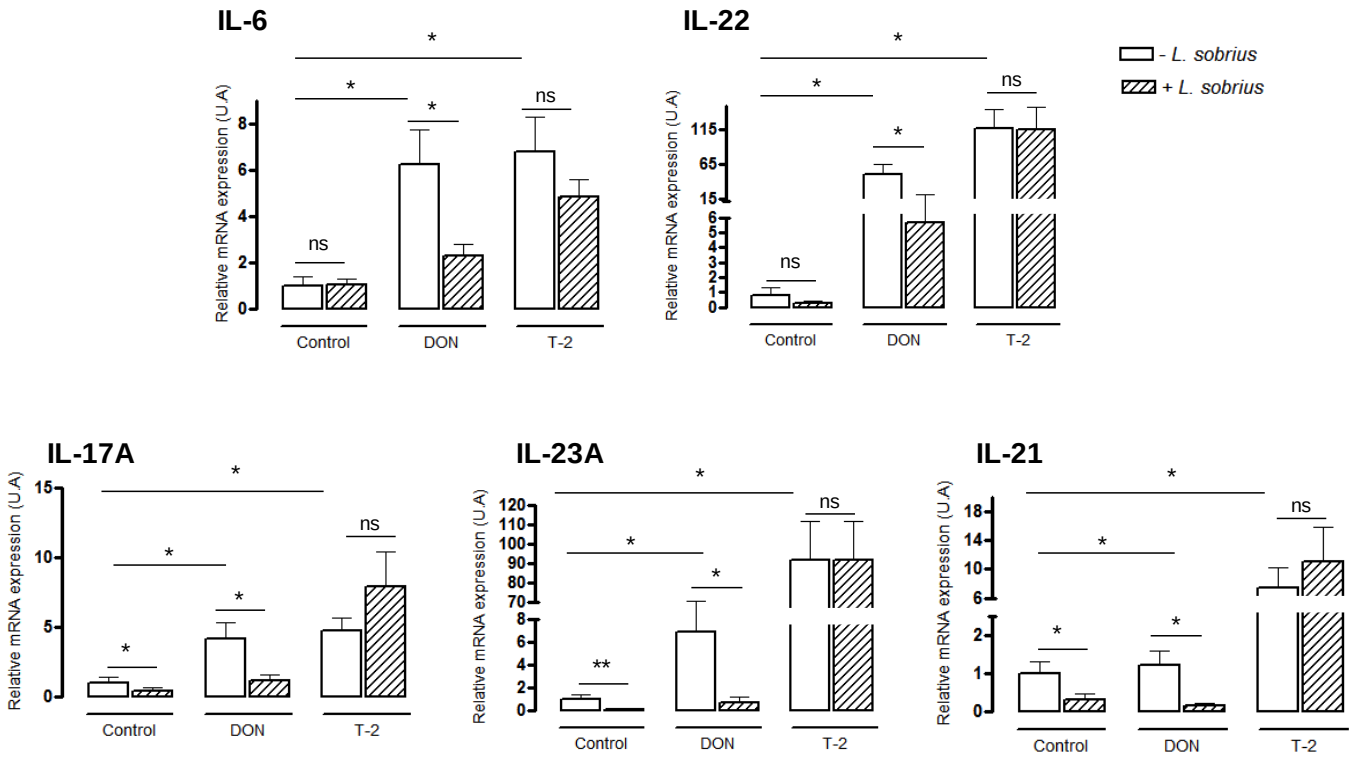


Figure 3: Modulation des gènes impliqués dans la différenciation et la production de la voie inflammatoire IL-17 par *Lactobacillus sobrius* sur un modèle *ex vivo* d'explants intestinaux pré-traités avec les mycotoxines DON ou T-2. Les explants intestinaux de porc sont mis en culture en présence de 10 µM de DON ou de 3 nM de toxine T-2 pendant 1h. A la suite de cette incubation, le milieu de culture est échangé par du milieu de culture sans toxine puis les explants sont maintenus en culture pendant 3h en absence (histogrammes blancs) ou en présence de $1x10^9$ CFU/ml de *L. sobrius* (histogrammes hachurés). L'expression des gènes (IL-6, IL-22, IL-17A, IL-23A et IL-22) a été analysée par RT-qPCR. Les résultats sont normalisés par deux gènes de ménages (Cyclophilin A and RPL32). Les données représentent les valeurs moyennes +/- SEM obtenues à partir de six animaux différents. Les valeurs d'expression des gènes sont exprimées de façon relative au groupe contrôle. Les astérisques indiquent les différences significatives * $P < 0,05$ et **$P < 0,01$.

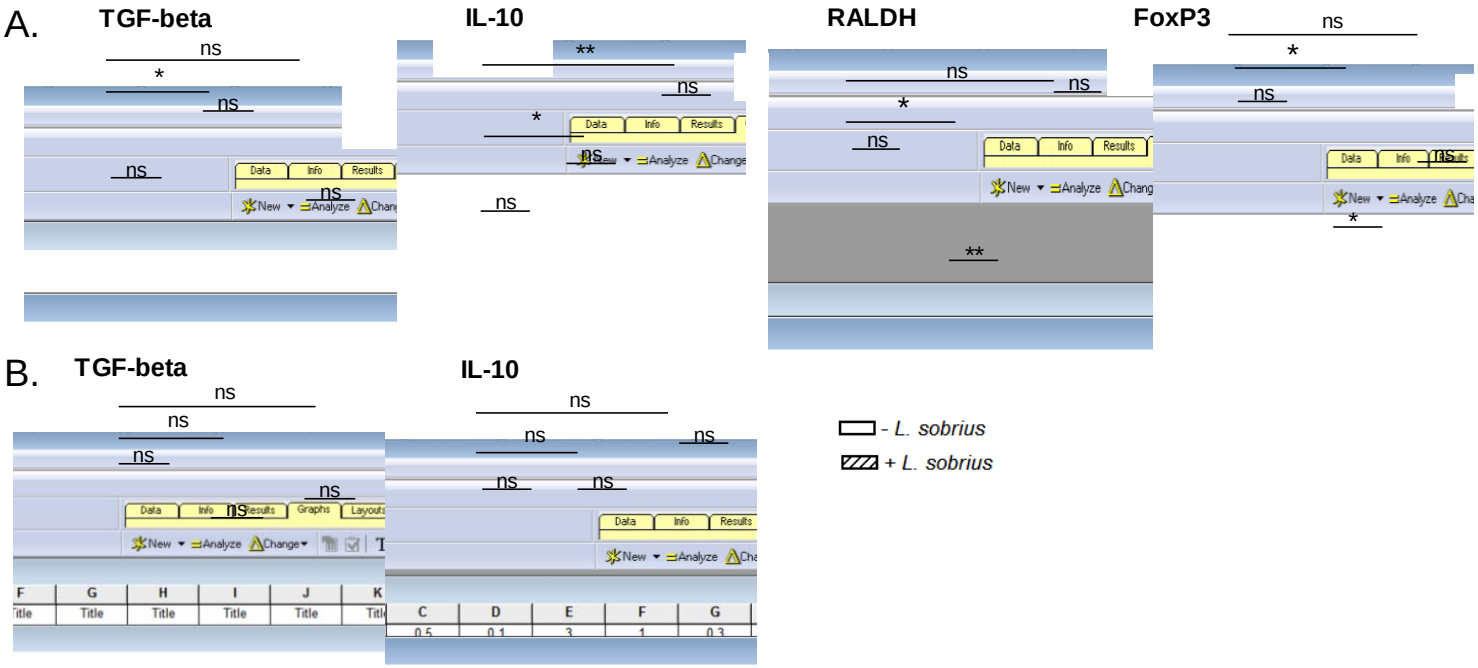

A.
TGF-beta
IL-10
RALDH
FoxP3
B.
TGF-beta
IL-10
- L. sobrius
+ L. sobrius
C.
Tregs CD4+
% of Treg CD4+ cells/ PBMCs totaux
[DON] µM
[T-2] nM
Tregs CD8+
% of Treg CD8+ cells / PBMCs totaux
[DON] µM
[T-2] nM

Figure 4

Figure 4 : Modulation de la voie T régulatrice par *Lactobacillus sobrius* sur un modèle *ex vivo* d'explants intestinaux pré-traités avec les mycotoxines DON ou T-2. Les explants intestinaux de porc sont mis en culture en présence de 10 µM de DON ou de 3 nM de toxine T-2 pendant 1h en absence de *L. sobrius*. A la suite de cette incubation, le milieu de culture est échangé par du milieu de culture sans toxines puis les explants sont maintenus en culture pendant 3h en absence (histogrammes blancs) ou en présence de $1x10^9$ CFU/ml de *L. sobrius* (histogrammes hachurés). Les cytokines TGF-beta et IL-10 ont été dosées par ELISA dans les surnageants de culture (A). Les tissus sont conservés pour l'analyse transcriptomique des gènes (TGF-beta, RALDH et FoxP3 et IL-10) (B). L'expression des gènes est analysée par RT-qPCR. Les résultats sont normalisés par deux gènes de ménages (Cyclophilin A and RPL32). Les données représentent les valeurs moyennes +/- SEM obtenues à partir de six animaux différents. Des PBMCs sont exposées à des concentrations croissantes de DON (0,1 et 1 µM) ou de toxine T-2 (0,3 et 3 nM). Les cellules sont incubées après 48h en présence de DON ou de toxine T-2 et en absence (histogrammes blancs) ou en présence de *L. sobrius* ($1x10^9$ CFU/ml) (histogrammes hachurés). Le marquage CD4/CD8/CD25/FoxP3 a été analysé par cytométrie en flux. Les graphiques représentent la moyenne +/- SEM provenant de culture de PBMCs isolées à partir de deux porcs différents. Les différences significatives entre le groupe contrôle et les groupes traités sont notées par des astérisques : **P < 0,01; *** P < 0,001.

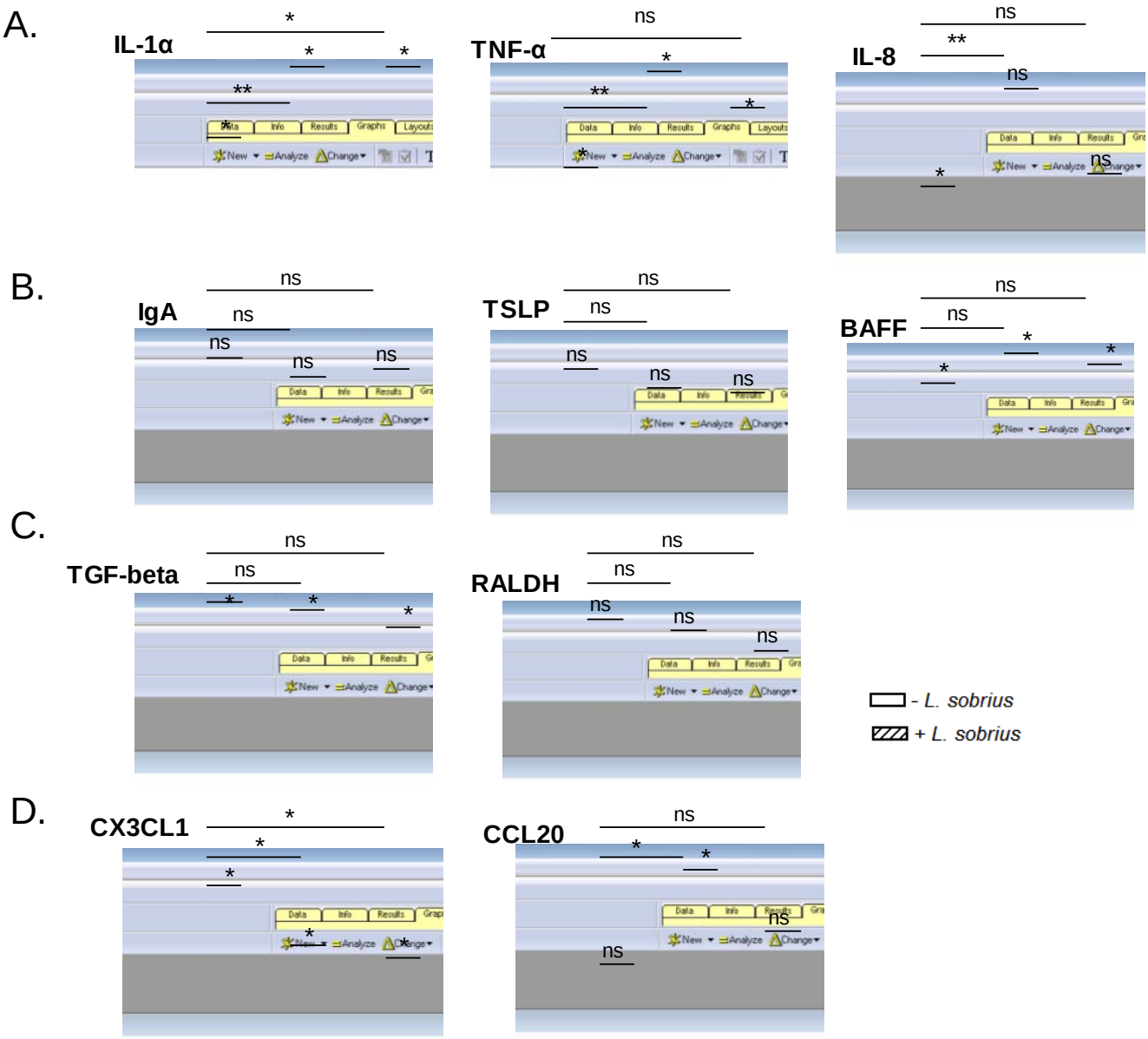
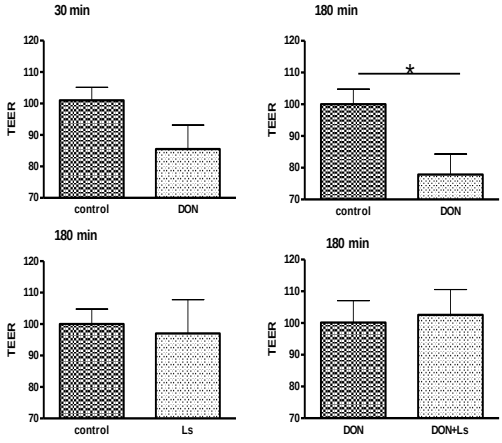

A.
IL-1α
TNF-α
IL-8
B.
IgA
TSLP
BAFF
C.
TGF-beta
RALDH
- L. sobrius
+ L. sobrius
D.
CX3CL1
CCL20

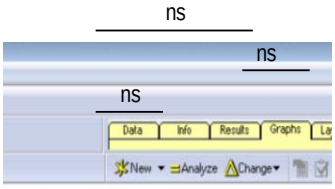
Figure 5

Figure 5 : Modulation par *Lactobacillus sobrius* des différents gènes exprimés par les cellules IPEC-1 pré-traitées avec les mycotoxines DON ou T-2. (A) Expression des gènes pro-inflammatoires (B) Expression des gènes de la réponse humorale ; (C) Expression des gènes impliqués dans la différenciation des Tregs et (D) Expression des gènes des chémokines. Les cellules de la lignée épithéliales intestinales de porc (IPEC-1) sont mises en culture en présence soit de 10 µM de DON, soit de 3 nM de toxine T-2 et en absence (histogrammes blancs) ou en présence de *L. sobrius* ($1x10^9$ CFU/ml) (histogrammes hachurés) comme décrit précédemment dans le modèle d'explants intestinaux. L'expression des gènes est analysée par RT-qPCR. Les résultats sont normalisés par deux gènes de ménages (Cyclophilin A and RPL32). Les données représentent les valeurs moyennes +/- SEM obtenues à partir de quatre cultures indépendantes. Les valeurs d'expression des gènes sont relatives au groupe contrôle sans toxine (histogrammes blancs). Les astérisques indiquent les différences significatives * $P < 0,05$ et **$P < 0,01$.

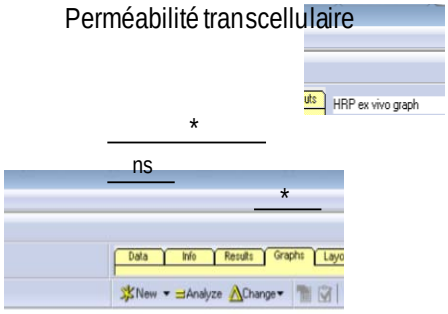
A. Résistance électrique trans-épithéliale



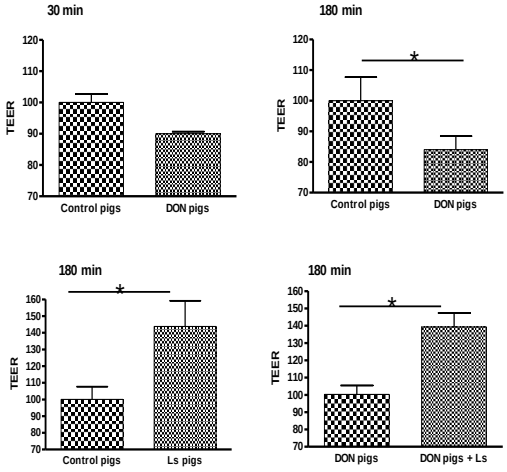
Perméabilité paracellulaire



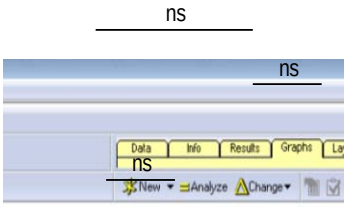
Perméabilité transcellulaire



B. Résistance électrique trans-épithéliale



Perméabilité paracellulaire



Perméabilité transcellulaire

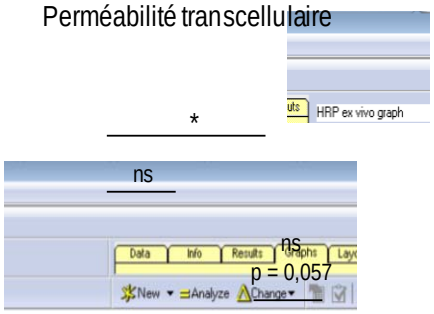


Figure 6

Figure 6 : Effet de *Lactobacillus sobrius* sur la résistance électrique trans-épithéliale (R) et les flux para- et trans-cellulaires suite à une exposition *ex vivo* (A) ou *in vivo* (B) au DON. Des tissus intestinaux sont placés en chambre d'Ussing afin d'évaluer la résistance électrique (R) en fonction des différents traitements : contrôles ; *L.sobrius* ; DON ; DON + *L. sobrius* à différents temps. Les valeurs de R sont représentées à 30 et 180 min (A). Les tissus sont incubés directement avec le DON (10 µM) en apical *ex vivo* dans les chambres d'Ussing pendant 1h puis les bactéries sont ajoutées pendant 3h; (B) l'exposition des tissus au DON est réalisée *in vivo* par gavage pendant 14 jours à une dose de 0,3 mg de DON/kg de poids vif/j, les bactéries sont ajoutées dès la mise en place des tissus dans les chambres d'Ussing pendant 3h. A la fin de l'incubation, les milieux des compartiments muqueux et séreux sont récupérés afin de déterminer le passage paracellulaire du FITC-dextran 4KDa et le passage transcellulaire de la HRP intacte. L'ensemble des mesures a été réalisé sur des tissus en duplicat (2 chambres/conditions). Les données représentent les valeurs moyennes +/- SEM obtenues à partir de 4 porcelets. Les astérisques indiquent les différences significatives * $P < 0,05$ et ** $P < 0,01$.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

En tant qu'interface entre le milieu extérieur et les éléments qui composent le « soi », les muqueuses sont les premières cibles de contamination par des agents pathogènes ou des xénobiotiques tels les pesticides, les polluants ou les mycotoxines. Des études antérieures ont montré que les mycotoxines de la famille des trichothécènes perturbent la fonctionnalité des muqueuses respiratoires et intestinales (Gerberick and Sorenson, 1983; Oswald et al., 2005; Pinton et al., 2012a; Thurman et al., 1988). Ces muqueuses sont composées de nombreux types cellulaires qui interviennent autant dans l'immunité innée (monocyte/macrophage, polynucléaires, cellules dendritiques, cellules T innées ou encore cellules épithéliales) que dans l'immunité acquise (lymphocytes T et B). Elles participent de façon active au maintien de l'homéostasie à l'encontre des diverses agressions auxquelles elles doivent faire face. Largement décrits dans la littérature, les trichothécènes sont de puissants immunomodulateurs connus pour agir à la fois sur les cellules immunitaires (Bimczok et al., 2007; Hymery, 2006; Pestka and Zhou, 2006; Seeboth et al., 2012) et sur les fonctions de barrière (Goossens et al., 2012; Pinton et al., 2011; Pinton et al., 2009). Tenant compte de toutes ces données, nous avons entrepris d'évaluer l'effet de deux trichothécènes, le DON et la toxine T-2 sur la différenciation, les fonctions ainsi que les différents dialogues existant entre les acteurs immunitaires composant les muqueuses respiratoires et intestinales.

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)

Des agents pathogènes ou d'autres composés tels que les mycotoxines peuvent contaminer l'organisme en franchissant la peau ou les muqueuses. Lors du passage de la barrière épithéliale, différentes cellules de l'immunité présentes dans ces tissus, souvent qualifiées de cellules résidentes, reconnaissent les signaux de dangers émis par ces perturbations. Il s'agit des cellules dendritiques et des macrophages, cellules sentinelles de l'organisme, des lymphocytes et des mastocytes ou d'autres cellules immunocompétentes telles que les cellules épithéliales. En tant que CPA, les macrophages ont un rôle central dans les réponses immunitaires. Ainsi, suite à reconnaissance des motifs moléculaires caractéristiques des pathogènes, les macrophages vont s'activer et produire des composés

tels que les cytokines ou le NO permettant la destruction de la cellule infectée ou « anormale » Ces cellules représentent donc un mécanisme de défense pour l'organisme, contre les agressions environnementales notamment par les bactéries et les virus. La présence concomitante de trichothécènes pourrait alors interférer dans les processus de reconnaissance de ces agents pathogènes soit en modulant l'expression des récepteurs des PRRs soit en altérant les fonctions des cellules capables d'effectuer cette reconnaissance. La première partie de ce travail de doctorat a eu pour objectif d'évaluer l'effet de la toxine T-2 sur la capacité d'activation des macrophages alvéolaires porcins activés par les différents agonistes des TLRs. Les résultats de ce travail montrent qu'une exposition à de faibles doses de toxine T-2 (3 nM), comparable à la dose journalière tolérable (Tolerable Daily Intake = 100 ng/kg de poids corporel/jour), diminue l'activation des macrophages alvéolaires porcins suite à leur induction par différents motifs bactériens (lipopolysaccharide ou LPS, peptidoglycanes et acides lipotéichoïques). Cette diminution de l'activation des macrophages affecte alors la synthèse des composés doués d'action microbicide (radicaux nitrogénés), de même qu'elle limite la production de deux cytokines pro-inflammatoires (IL-1β et TNF-α). Au vue de ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une telle inhibition pourrait avoir des conséquences importantes au niveau de l'initiation des défenses immunitaires en réponse à des contaminations bactériennes. Cette étude nous a donc permis d'une part de confirmer que la toxine T-2 cible les macrophages et d'autre part de définir un nouveau mode d'action de la toxine T-2 permettant de mettre en évidence un nouveau mécanisme d'action de cette molécule vis-à-vis de la susceptibilité aux infections (Seeboth et al, 2012, Vet research) (figure 26).

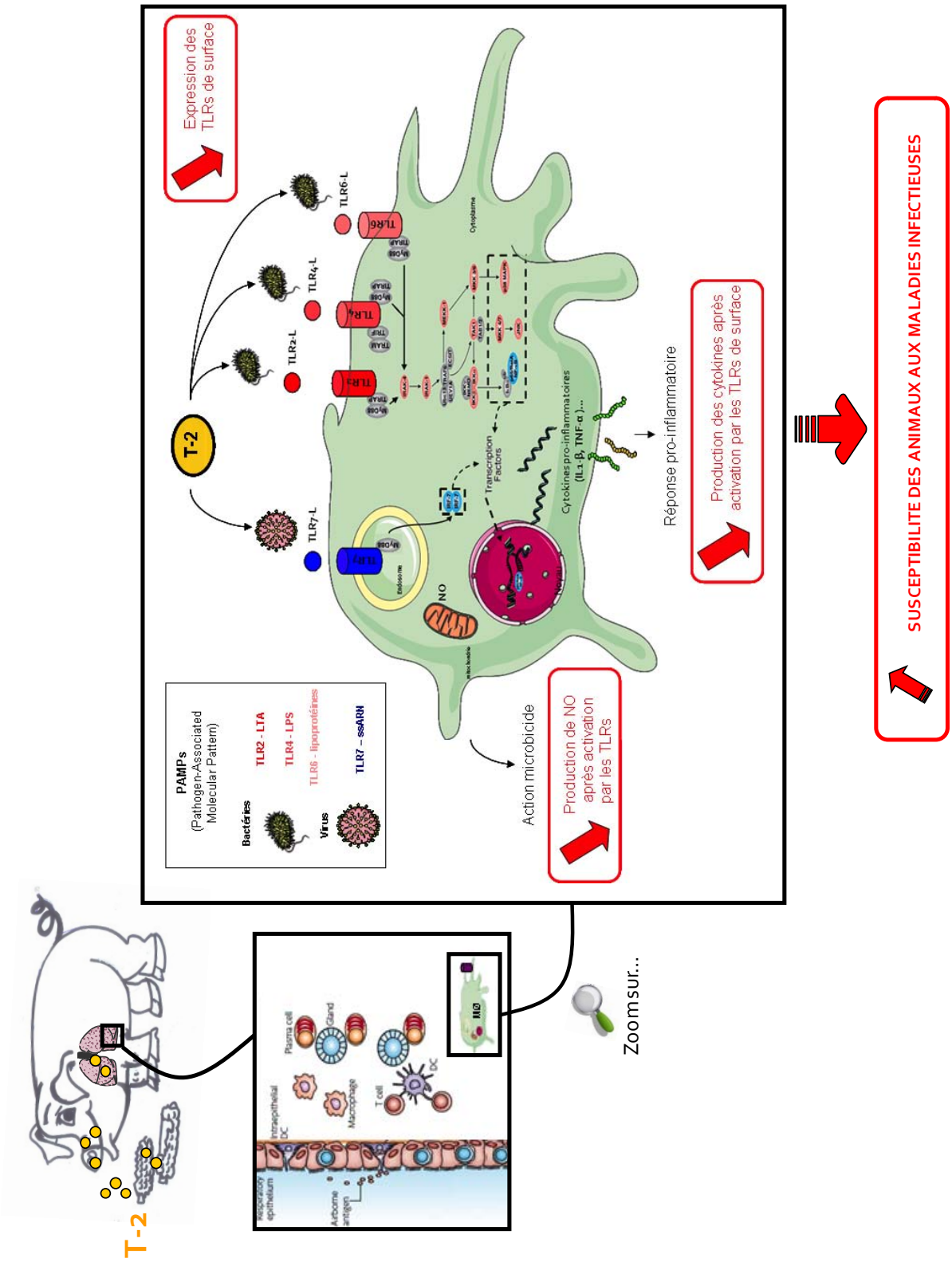


Figure 26 : Schéma général des résultats obtenus au cours de l'étude 1

L'espèce porcine est très sensible aux mycotoxines et notamment aux trichothécènes. Outre le risque de contamination par ingestion de l'aliment, le porc peut également inhaler les mycotoxines lorsqu'elles sont présentes dans les poussières d'aliments ou les aliments eux-mêmes. En effet, cette exposition aux mycotoxines peut se produire lors de l'inhalation de spores, de fragment de mycélium ou d'hyphes, petites particules relarguées par des colonies des moisissures ou poussières d'aliments contaminés. Les spores de moisissures sont considérées comme un des transporteurs les plus importants des mycotoxines dans l'air. La taille des spores de moisissures varie de 2 à 10 µm selon les espèces (Eduard, 2009) mais la majorité est inférieure à 5 µm (Sorenson, 1999). Du fait de leur faible diamètre, ces particules peuvent pénétrer dans les bronchioles et entrer dans la région alvéolaire pouvant affecter les propriétés des cellules résidentes, notamment des macrophages alvéolaires et favoriser ainsi le développement du champignon. Ainsi, un environnement contaminé par des moisissures productrices de mycotoxines peut être un facteur de risque pour les voies respiratoires. Parmi ces environnements riches en spores de moisissures, la présence de mycotoxines telle que la trypacidine et la tryptoquivaline a été décelée dans l'air d'une usine de compostage de déchets pour une concentration en spores viables d'*Aspergillus fumigatus* de $3{,}2x10^7$ /m^3 d'air (Fischer et al., 1999; Fischer et al., 2000). De plus, une importante teneur en mycotoxines a été également décelée dans les poussières de céréales dans 90% à 100% des échantillons testés (Halstensen et al., 2004; Krysinska-Traczyk et al., 2001; Nordby et al., 2004). En effet, plusieurs études ont montré que ces poussières de denrées alimentaires pouvaient contenir souvent plus de mycotoxines que les denrées alimentaires elles-mêmes (Gareis and Meussdoerffer, 2000; Krysinska-Traczyk et al., 2001; Krysinska-Traczyk et al., 2007; Krysinska-Traczyk et al., 2003). Ainsi, l'équipe de Krysinska-Traczyk (2007) a détecté la présence de *Fusarium spp.* sur 5 types de grains différents (riz, blé, avoine, orge et sarrasin) mais a aussi détectée la présence de mycotoxines, notamment du DON, du nivalénol (NIV) et de l'Ochratoxine A (OTA) dans les poussières de céréales. Dans cette étude, ces auteurs ont, par exemple, montré que le DON est présent dans 79,2% des échantillons de grains et dans 100% des échantillons de poussières de grains (Krysinska-Traczyk et al., 2007).

En effet, en inhibant les actions protectrices immunitaires des macrophages alvéolaires, les mycotoxines induisent chez l'individu un état immuno-déficient favorable à

l'apparition d'infections opportunistes dans les élevages, ce qui amplifie leurs effets délétères sur santé animale. Chez la souris, Li et al. (2006) ont montré qu'une pré-exposition à la toxine T-2 via une injection intra-péritonéale de 1,75 mg de toxine T-2 /Kg poids corporel, correspondant à environ 1/3 de la DL_{50} selon Ueno, Y. (1984), suivi d'une inoculation intra-nasale de la souche Lang du réovirus respiratoire diminue la résistance de l'hôte contre ce virus responsable de bronchiolites (Li et al., 2006). D'autres études ont également porté sur l'impact de l'ingestion de toxine T-2 sur la susceptibilité aux infections notamment bactériennes telles que *Listeria monocytogenes, Salmonella Typhimurium* et *Mycobacterium bovis* (Tai and Pestka, 1990; Ziprin and McMurray, 1988).

De nombreux agents pathogènes viraux sont la cause de maladies infectieuses entrainant des pertes économiques importantes pour l'élevage porcin. Par exemple, le virus responsable du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) est responsable de 664 millions de dollars US de perte/an aux Etats-Unis, faisant d'elle l'une des maladies ayant l'impact économique le plus élevé pour l'élevage porcin à l'heure actuelle (Holtkamp et al., 2012). En France, la prévalence de cette infection est élevée atteignant 60% dans certaines régions. Ce virus présente un tropisme particulier pour la sphère respiratoire, notamment pour les macrophages issus des poumons et des tissus lymphoïdes (FAO, 2010). La souche faiblement virulente de ce virus est celle principalement retrouvée dans les élevages, entrainant ainsi une circulation du virus sans apparition de symptômes ou de mortalité importante. L'altération de la réponse immunitaire suite à une exposition à la toxine T-2 pourrait permettre à cette souche faiblement virulente de s'étendre dans les élevages et de sévir de façon plus drastique, augmentant alors la mortalité des porcs à travers notamment une potentialisation de la susceptibilité de ces animaux aux infections secondaires. Ainsi, les résultats obtenus au cours de cette première étude permettent d'ouvrir une nouvelle piste d'étude concernant l'implication des mycotoxines et plus particulièrement des trichothécènes dans la susceptibilité des animaux aux infections opportunistes.

De plus, ce travail de thèse a également montré que la toxine T-2 peut perturber la maturation des cellules dendritiques (DCs) du porc au niveau systémique (publication 3, en préparation). Ces résultats sont en accord avec les données d'Hymery et al. (2006) utilisant des cellules d'origine humaine (Hymery, 2006) témoignant ici d'une proximité immunologique entre l'Homme et le porc. Ce défaut de maturation réduit la capacité de

présentation des antigènes aux lymphocytes T naïfs et diminue par ce biais la mise en place des réponses effectrices contre les agents pathogènes.

Ainsi, de par ces atteintes fonctionnelles sur les CPA (notamment sur les macrophages et DCs) la toxine T-2 induit une immunosuppression du système immunitaire qui peut augmenter la susceptibilité de l'hôte à des maladies pulmonaires, telle que l'asthme chez l'Homme. En effet, chez les personnes souffrant d'asthme, les moisissures ou poussières contenant des éléments de moisissures peuvent aggraver les symptômes asthmatiques et allergiques. Ainsi en perspective à ce travail de recherche, il serait intéressant d'évaluer l'effet de ces mycotoxines et notamment de la toxine T-2 sur les prédispositions à l'asthme. Dans ce but, nous pourrions envisager l'utilisation des modèles rongeurs (rats Sprague‑Dawley (asthmatiques par injection intra-péritonéal d'un antigène tel que l'ovalbumine (Han et al., 2013; Tan et al., 2013)). De même, qu'il serait également pertinent d'évaluer l'impact d'une exposition mycotoxique sur l'augmentation de la prévalence des phénomènes d'allergies qu'ils soient respiratoires ou même alimentaires en utilisant des souris BALB/c sensibilisées à des allergènes alimentaires (par exemple après administration intra-péritonéale de gliadines déamidées) (Gourbeyre et al., 2013; Han et al., 2013). L'évaluation des symptômes et de certains critères associées à ces pathologies tels qie les niveaux d'IgE, d'IgG1, d'IL-4 ou encore d'IL-17 permettrait alors d'établir un lien potentiel direct entre mycotoxines et recrudescence des maladies allergiques. Ce lien entre trichothécènes et allergies est d'autant plus pertinent que la suite de ce travail de doctorat a montré qu'une exposition intestinale aux trichothécènes (DON et toxine T-2) induit principalement les voies de production de l'IL-17 (étude 2), cytokine augmentée dans les cas d'allergie.

B. Les trichothécènes induisent une pro-inflammation associée une induction de l'IL-17 au niveau intestinal

De façon comparable à la muqueuse pulmonaire, la muqueuse intestinale est une cible des trichothécènes. Ces mycotoxines sont des contaminants naturels des denrées alimentaires, notamment des céréales (blé, orge, maïs, seigle). Elles se retrouvent donc en contact direct avec la barrière intestinale après ingestion. Considérant qu'une grande partie

de la production céréalière est destinée aux animaux d'élevage, dont le porc, les mycotoxines sont donc au cœur des problématiques de santé animale et entraînent des pertes économiques considérables estimées entre 630 millions et 2,5 milliards de dollars annuellement aux Etats-Unis (Wu, 2004). En effet, de par son alimentation riche en céréales, le porc est naturellement exposé à la contamination mycotoxique. De plus, le porc est une des espèces la plus sensible à la plupart des mycotoxines. C'est pourquoi les concentrations maximales réglementaires en mycotoxines fixées par la commission Européenne sont plus faibles pour l'espèce porcine que pour les autres espèces (volailles, ruminants). Cette sensibilité plus accrue des porcs vis-à-vis des mycotoxines, peut être associée à l'absence de rumen qui joue un rôle important dans la détoxification des toxines.

La seconde partie de ce travail de doctorat a porté sur l'étude des effets du DON et de la toxine T-2 sur l'homéostasie immunitaire intestinale. L'impact de ces deux trichothécènes a été évalué sur différentes cibles immunitaires, d'une part sur les cellules de la barrière intestinale (IEC) et d'autre part au sein de la *lamina propria.* Dans ce but, différents modèles ont été utilisé, soit *in vivo* par exposition de la muqueuse intestinale en utilisant la technique des anses intestinales, soit *ex vivo* par exposition des toxines sur un modèle d'explant de jéjunum, ou encore *in vitro* par utilisation de cellules épithéliales en culture, de cellules dendritiques dérivées des monocytes ou de PBMCs stimulées par des mitogènes. En raison du coût des mycotoxines purifiées, du maintien des animaux pendant de longues périodes d'exposition chronique et de la nécessité des réplicas biologiques, les expériences d'ingestion des mycotoxines *in vivo* bien que plus réalistes sont difficilement envisageables. Ainsi, l'ensemble de ces approches *in vivo, ex vivo* et *in vitro* au cours de ce travail respectant alors les règles éthique vis-à-vis de l'expérimentation animale basée sur les 3 R. De plus, ces modèles ont permis de disséquer le mécanisme d'action de ces trichothécènes sur certaines sous-populations cellulaires présentes au sein de la *lamina propria*, d'en comprendre leur modulation et leur rôle dans la mise en place d'une homéostasie immunitaire.

Lors d'une première étude descriptive, ces recherches ont montré qu'une exposition à de faibles concentrations de DON provoque une réponse pro-inflammatoire aussi bien par des cellules épithéliales intestinales (IPEC-1) que par des explants intestinaux (Seeboth et al, 2013, PlosOne). Cette mycotoxine induit également l'expression des cytokines impliquées

dans la voie IL-17 avec suppression de la voie Tregs. Dans une étude complémentaire, nous avons cherché à comparer l'effet du DON avec celui provoqué par une mycotoxine appartenant à la même famille des trichothécènes, la toxine T-2 (publication 3, en préparation). Cette étude a confirmé les résultats obtenus précédemment en présence d'une exposition au DON et montre que la toxine T-2 induit elle aussi une réponse pro-inflammatoire ainsi qu'une orientation vers le profil inflammatoire IL-17. Des études plus mécanistiques ont déterminer que l'augmentation d'IL-17 synthétisée en réponse au DON et à la toxine T-2 est produite de façon majoritaire par les cellules Tγδ et partiellement par les Th17 décrites chez le porc (Stepanova et al., 2012). Cependant, d'autres types cellulaires sont capables de produire cette cytokine telle que les ILC17 ou les cellules NKT. Ces dernières, comme les cellules T $CD4^+$ productrices d'IL-21, ont également été décrites comme une source d'IL-21 (Liu et al., 2013b). Ainsi, bien que le DON et la toxine T-2 induisent la sécrétion d'IL-17 via les cellules Tγδ, d'autres cibles cellulaires peuvent être affectés préférentiellement par l'une ou l'autre de ces toxines. Ainsi, l'induction du gène IL-21, initiée très précocement en présence de toxine T-2 à l'inverse du DON, laisse suggérer que le DON ciblerait davantage les cellules Tγδ tandis que la toxine T-2 ciblerait davantage les cellules productrices d'IL-21. Au niveau intestinal, l'ensemble des données que nous obtenu ont permis de conclure qu'en réponse à une exposition au DON et à la toxine T-2, le système immunitaire met en place une réponse hautement inflammatoire de type IL-17 associée à une diminution de l'ensemble des sous-populations de cellules T regs (figure 27).

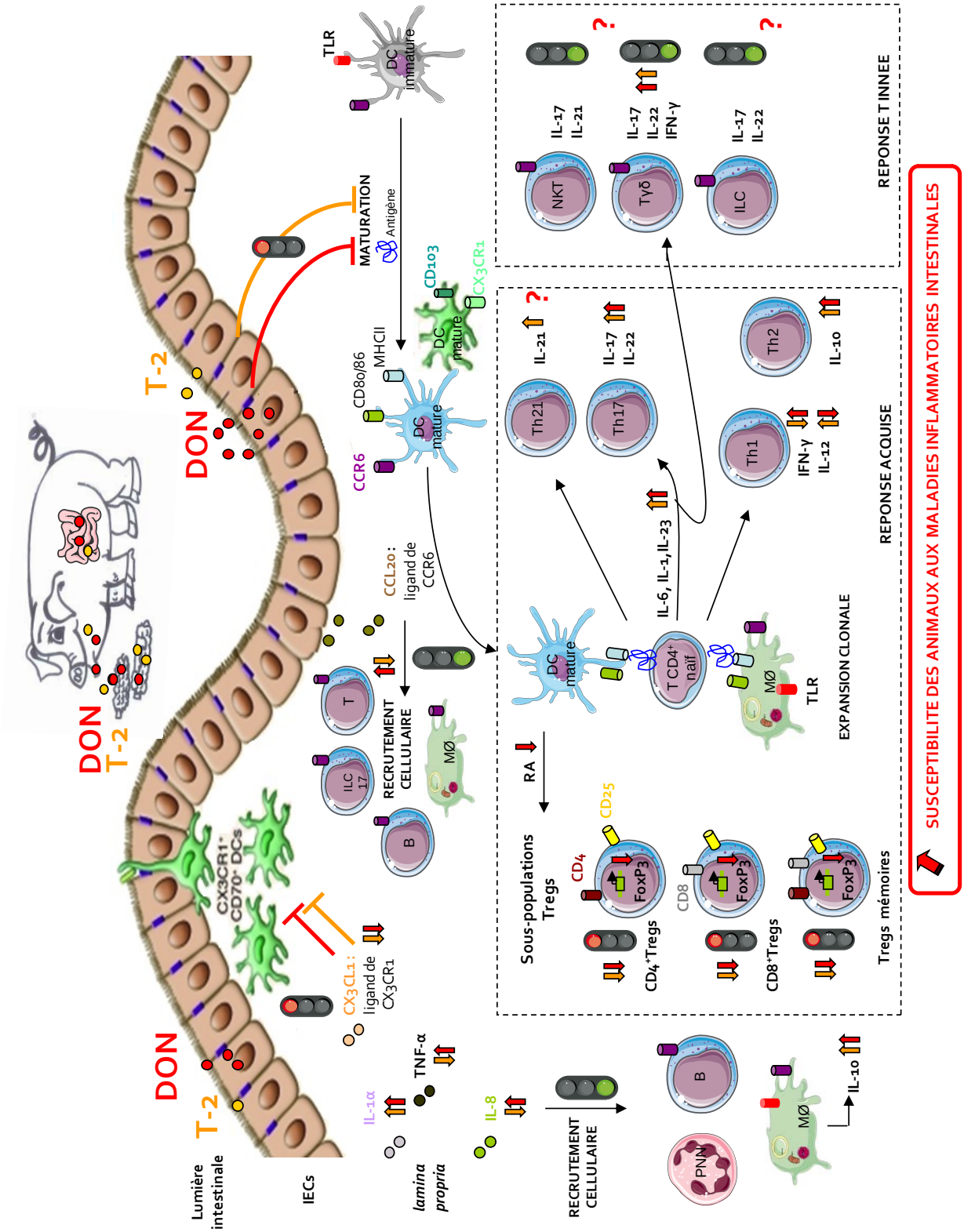


Figure 27 : Schéma général des résultats obtenus au cours de l'étude 2

Les IECs, partenaires du dialogue immunitaire et premier élément de barrière face à l'intrusion des agents pathogènes et des mycotoxines, jouent un rôle important dans la modulation et l'initiation des réponses immunitaires. Ces travaux de recherche ont montré que le DON comme la toxine T-2 pouvaient moduler de façon différentielle les niveaux d'expression des chémokines et/ou des cytokines pro-inflammatoires produites par ces IECs intervenant ainsi de façon indirecte dans l'orientation des réponses immunitaires inflammatoires et dans le recrutement des cellules immunitaires au sein de la *lamina propria.* Au vue des nouvelles données acquises au cours de ce travail, il serait désormais intéressant de préciser quel est le rôle des IECs dans les échanges cellulaires mis en jeu au cours des réponses immunitaires lors d'une exposition mycotoxique. Pour cela, des expériences de co-cultures d'IECs et de diverses cellules immunitaires (cellules T naïfs, DCs ou macrophages) pourraient être envisagées visant à établir des liens précis entre ces différents types cellulaires.

L'inflammation intestinale générée par l'exposition aux trichothécènes mais également les effets en termes d'immunomodulation pourrait être un facteur déclenchant la prédisposition des animaux aux infections au niveau de l'intestin. En effet, le porc est également sujet à de nombreuses infections intestinales d'origine bactérienne telles qu'*Escherichia coli pathogènes (K88, O78:K80, O141:K85, O9, autres)* (Marie et al., 2001) et *Salmonella enterica subsp enterica* pathogènes dont la séroprévalence a été estimée à 46% (échantillonnages effectués sur de 113 élevages en 200 (Lemistre, 2002). Les *Escherichia coli* enterotoxiques pathogènes sont des bactéries possédant des adhésines fimbriaires qui permettent leur adhésion à des récepteurs spécifiques sur les cellules épithéliales de l'intestin au niveau du jéjunum et/ou de l'iléon. Cette bactérie produit des entérotoxines qui provoquent des diarrhées entraînant une déshydratation, une diminution du gain de poids, et/ou la mort de l'animal. Il en est de même pour les bactéries pathogènes *Salmonella enterica subsp enterica.* L'incidence de ces infections a des conséquences importantes en élevage porcin. En effet, ces diarrhées provoquent souvent un ralentissement de la croissance lors de la période du sevrage, entrainant un sévère impact sur le taux de mortalité et donc de façon globale une diminution de rendement de la production porcine (FAO, 2010). La présence des trichothécènes dans les élevages (alimentation, poussières d'aliments) pourrait potentialiser les susceptibilités à ces infections intestinales.

Le porc présente des caractéristiques très proches de celles de l'Homme notamment concernant les systèmes digestif et immunitaire. De plus, du fait de ces similitudes (taille et caractéristiques physiologiques des organes) avec l'Homme, le porc offre de nombreux avantages en tant que modèle animal dans l'étude des xénotransplantations, des maladies pulmonaires et cardiovasculaires, du système reproductif, des fonctions métaboliques, des désordres digestifs ou encore des pathologies immunologiques (Guilloteau et al., 2010; Miller and Ullrey, 1987; Rothkotter et al., 2002).

Etant proche immunologiquement de l'Homme, les réponses inflammatoires observées au niveau intestinal chez le porc peuvent être extrapolées à l'homme. L'ingestion de DON et de T-2 pourrait faire partie des facteurs environnementaux capables de déclencher les IBD ou être responsable de leur persistance (Maresca and Fantini, 2010). Les principales IBD sont la maladie de Crohn et la colite ulcérative. Les principaux symptômes de ces maladies sont similaires : des douleurs abdominales et des crampes intestinales. Des diarrhées sanguinolentes, une perte de poids, de la fièvre et de l'anémie peuvent également survenir. Ces maladies atteignent aujourd'hui près de 2% de la population des pays industrialisés, soit des millions de personnes, sans réelle solution thérapeutique à leur fournir pour soulager leur douleur. Divers éléments tels que les agents pathogènes ou les mycotoxines pourraient générer une perturbation de l'équilibre immunitaire de personnes prédisposées génétiquement aux IBD, entrainant l'apparition de la maladie. L'axe IL-17/IL-23 est généralement associé à la prévalence des IBD. En effet, les patients souffrants d'IBD présentent une augmentation des transcrits d'ARNm d'IL-17 et une accumulation intracellulaire de la protéine IL-17 au niveau de la muqueuse intestinale (Fujino et al., 2003). Différentes études ont montré que la génération des IBD peut également venir d'un défaut en cellules T régulatrices (Brimnes et al., 2005; Taams et al., 2006). A travers l'induction des voies productrices d'IL-17 et/ou la diminution de la réponse Treg, les mycotoxines pourraient être à l'origine de la chronicité ou de la persistance de l'inflammation observée dans la maladie de Crohn ou la colite ulcérative.

Possibles apports des effets protecteurs des bactéries commensales : *Lactobacillus sobrius* DSM 16698T Compte tenu des préjudices économiques majeurs et sanitaires imputés à l'occurrence des trichothécènes, de nombreuses stratégies sont aujourd'hui développées

pour lutter contre leur présence et/ou les effets toxiques qu'ils génèrent. Parmi elles, les microorganismes telles que les bactéries commensales, utilisées comme probiotiques font partie des voies de recherches actuelles pour lutter contre les maladies inflammatoires de l'intestin telles que les IBD. Aujourd'hui, le mécanisme des probiotiques est encore mal compris. Différentes hypothèses se dessinent cependant telles que 1/ la suppression ou l'élimination des bactéries entéropathogènes ; 2/ l'inhibition de l'activité métabolique des bactéries pathogènes et 3/ la stimulation des mécanismes de défenses non spécifiques et immunitaires de l'hôte.

Chez le porcelet, la fréquence des diarrhées après le stress du sevrage posent des problèmes majeurs. Ainsi, la réduction de l'incidence des diarrhées par les probiotiques a été largement étudiée (tableau 10).

Probiotiques	Âge (jours)	Incidence de diarrhée
Bacillus cereus	28-56	Diminuée
Bacillus cereus	24-66	Sans effet
Enterococcus faecium	1-70	Diminuée
Lactobacillus fermentum	1-63	Diminuée
Mélange de lactobacilles (*L. gasseri, L. reuteri, L. acidophilus et L. fermentum*)	28-42	Diminuée
Pediococcus acidilactici	5-28 1-56	Diminuée Sans effet
Saccharomyces cerevisiae	5-28 1-56	Diminuée Sans effet

Tableau 10 : Influence des probiotiques sur l'incidence de diarrhée chez le porcelet (comparaisons entre le groupe témoin et le groupe probiotique

Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés aux effets de la souche *Lactobacillus sobrius* DSM 16698T sur la réduction des effets inflammatoires et le défaut de perméabilité de la barrière intestinale initiés par les trichothécènes (publication en préparation). Peu d'études ont été menées sur les actions potentiellement bénéfiques de cette souche bactérienne au niveau intestinal. Cette souche de *Lactobacillus* induit cependant un effet protecteur vis-à-vis de bactéries pathogènes *enterotoxigenic Escherischia coli* (ETEC) à travers l'induction des protéines des jonctions serrées (ZO-1, occludines) sur des

IECs permettant également un renforcement de la barrière intestinale et l'induction de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 (Roselli et al., 2007).

Les résultats de cette étude ont permis de déterminer que *L. sobrius* DSM 16698T ne semble pas avoir d'effet protecteur vis-à-vis d'une exposition à la toxine T-2. Cependant, lors d'une pré-exposition au DON, elle a la capacité de diminuer l'inflammation de type IL-17 ainsi que la perméabilisation de la barrière intestinale provoquée par cette toxine. Deux hypothèses sont possibles pour expliquer cette dichotomie de réponses entre DON et toxine T-2 : 1/ la réponse immunitaire inflammatoire initiée en présence de toxine T-2 est trop élevée pour que la bactérie puisse avoir un effet protecteur ou 2/ les cibles immunitaires de la toxine T-2 sont différentes de celle du DON. Il est en effet envisageable que ce *Lactobacillus* agit spécifiquement sur la population Tγδ induite préférentiellement par une exposition au DON et moins à la toxine T-2 (figure 28).

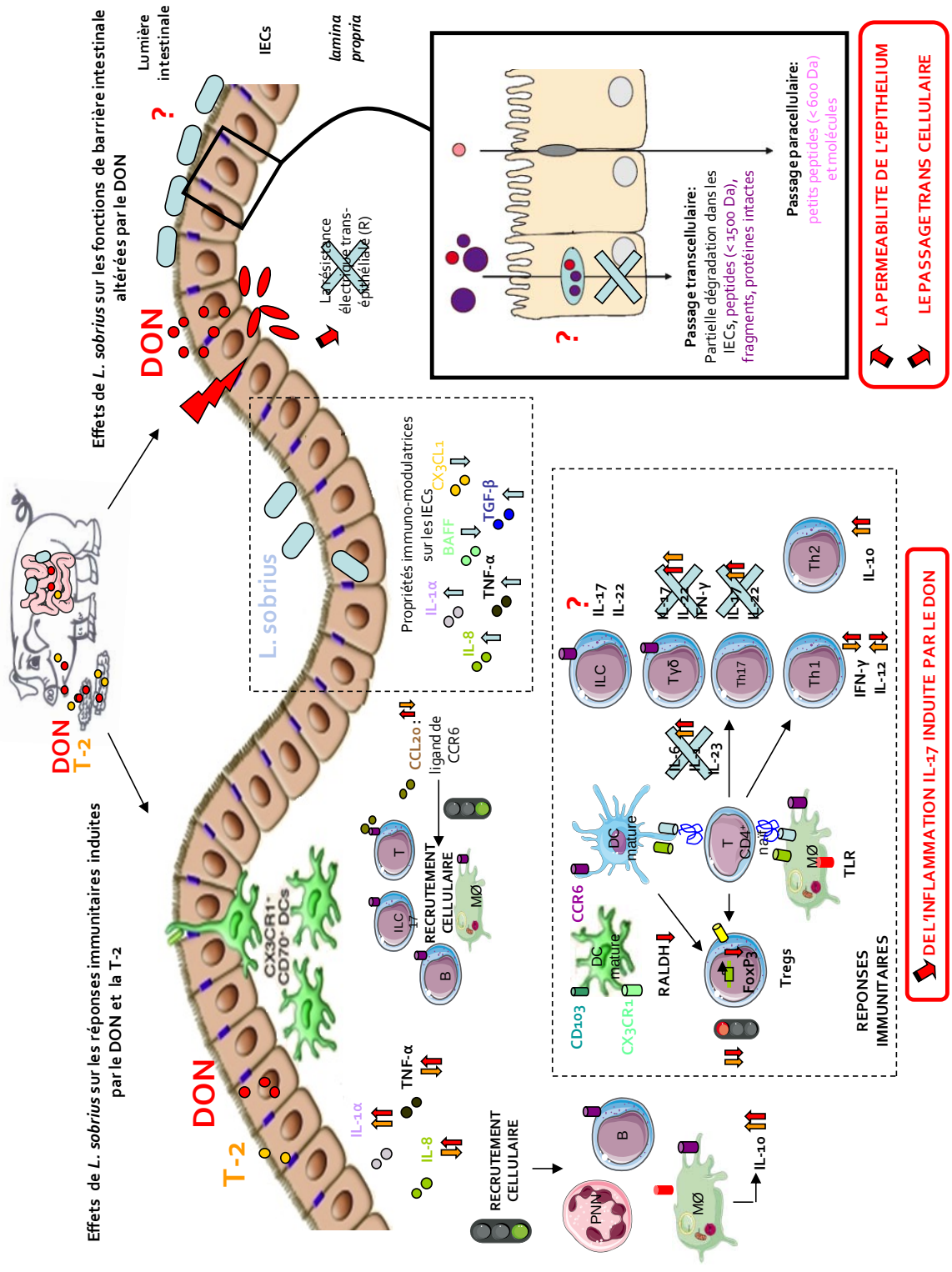


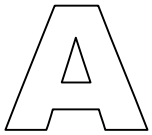
Figure 28: Schéma général des résultats obtenus au cours de l'étude 3

La balance IL-17/Tregs repose sur une délicate interaction entre tous les partenaires de l'intestin y compris les bactéries commensales. A l'heure actuelle, nous ne connaissons pas exactement quels sont les effets de ces bactéries commensales constituant le microbiote sur l'état inflammatoire de l'intestin et notamment sur l'équilibre de cette balance. Au cours de cette étude, nous avons observé à l'aide d'un modèle *in vitro* de cellules épithéliales intestinales (IPEC-1) que cette bactérie provoque une immunomodulation induisant de façon concomitante les voies inflammatoires (IL-8, IL-1, TNF-α) et régulatrices (TGF-β). De plus, de façon intéressante, nous avons également mis en évidence une action spécifique de cette bactérie commensale sur les voies de production de l'IL-17. Ces résultats pourraient alors nous permettre de mieux comprendre quel est le mécanisme d'action de ces bactéries tendant à limiter les voies de production de l'IL-17 et ainsi pourrait être le point de départ de nouveaux axes de recherches dans le développement de traitement vis-à-vis des maladies inflammatoires liées à la production d'IL-17 dont les IBD font partie. De plus, *L. sobrius,* ayant également été retrouvée au niveau du tractus intestinal chez l'Homme (Konstantinov et al., 2006), nous pourrions envisager d'améliorer l'état inflammatoire des patients atteints par des IBD en favorisant la croissance de cette bactérie au niveau intestinal . Aujourd'hui, de très nombreux candidats de Lactobacilles sont testés en se basant sur leur activité à induire des propriétés immuno-modulatrices. Ainsi récemment, Kechaou et ses collègues (2013) ont identifié un nouveau candidat : *Lactobacillus plantarum* CNRZ1997 capable d'initier une activité immunomodulatrice et notamment d'une activité pro-inflammatoire induisant la production de TNF-α et d'IL-8 sur deux modèles cellulaires différents (cellules HT-29 et PBMC). Dans cette même étude, cette bactérie s'est révélée active contre une infection par le virus de la grippe, réduisant en 14 jours la charge virale chez la souris. Cependant, bien que l'action de cette bactérie probiotique ait été mise en évidence face à une infection virale, ces mécanismes d'action ne sont pas élucidés. Néanmoins, quelques hypothèses peuvent être avancées. En effet, une autre étude a montré que les propriétés protectrices de *L. plantarum* contre le virus de la grippe sont dépendantes du récepteur TLR2 lequel reconnaît le peptidoglycane et les acides lipotéïchoïques des bactéries Gram+ (Kawashima et al., 2011). Ainsi, les *Lactobacilles* et notamment *L. sobrius* pourraient à travers l'expression de ces deux composés stimuler une réponse pro-inflammatoire bénéfique au niveau intestinal tout en

favorisant la réduction de la mise en place de la voie IL-17 générée par l'exposition aux trichothécènes contribuant au maintien de l'homéostasie inflammatoire intestinale.

Les résultats de cette dernière étude laissent un large champ d'étude sur les propriétés de *L. sobrius* DSM 16698T. En effet, outre la compréhension des mécanismes d'action de cette souche vis-à-vis de ces propriétés immunomodulatrices inflammatoires, celle-ci pourrait faire l'objet d'études plus poussées visant à en faire un probiotique dans les élevages, effet pouvant être testé pour une utrilisation en santé humaine. Cependant, d'autres études complémentaires doivent être réalisées. Ainsi, nous pourrions envisager une étude *in vivo* dans laquelle *L. sobrius* serait employée dans le but d'améliorer l'état inflammatoire de modèles animaux prédisposés aux maladies inflammatoires type maladie de Crohn ou colites ulcératives.

REFERENCES



Abouzied, M.M., Azcona, J.I., Braselton, W.E., Pestka, J.J., 1991, Immunochemical assessment of mycotoxins in 1989 grain foods: evidence for deoxynivalenol (vomitoxin) contamination. Appl Environ Microbiol 57, 672-677.

Abramson, D., Mills, J.T., Marquardt, R.R., Frohlich, A.A., 1997, Mycotoxins in fungal contaminated samples of animal feed from western Canada, 1982-1994. Can J Vet Res 61, 49-52.

AFSSA. 2009. Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans la chaîne alimentaire humaine et animale, pp. 1-339. Utilisation du chapitre 3."Trichothécènes"

Akbari, O., DeKruyff, R.H., Umetsu, D.T., 2001, Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. Nat Immunol 2, 725-731.

Akira, S., 2006, TLR signaling. Curr Top Microbiol Immunol 311, 1-16.

Akira, S., 2009, Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 85, 143-156.

Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006, Pathogen recognition and innate immunity. Cell 124, 783-801.

Alvarez, B., Revilla, C., Domenech, N., Perez, C., Martinez, P., Alonso, F., Ezquerra, A., Domiguez, J., 2008, Expression of toll-like receptor 2 (TLR2) in porcine leukocyte subsets and tissues. Vet Res 39, 13.

Alves, M.P., Neuhaus, V., Guzylack-Piriou, L., Ruggli, N., McCullough, K.C., Summerfield, A., 2007, Toll-like receptor 7 and MyD88 knockdown by lentivirus-mediated RNA interference to porcine dendritic cell subsets. Gene Ther 14, 836-844.

Andreev, K., Graser, A., Maier, A., Mousset, S., Finotto, S., 2012, Therapeutical measures to control airway tolerance in asthma and lung cancer. Front Immunol 3, 216.

Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fili, L., Ferri, S., Frosali, F., Giudici, F., Romagnani, P., Parronchi, P., Tonelli, F., Maggi, E., Romagnani, S., 2007, Phenotypic and functional features of human Th17 cells. J Exp Med 204, 1849-1861.

Anses 2011. Étude de l'alimentation totale française 2 (EAT 2) Tome 1 : Contaminants inorganiques, minéraux, polluants organiques persistants, mycotoxines, phyto-

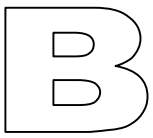
estrogènes Tome 2 : Résidus de pesticides, additifs, acrylamide, hydrocarbures aromatiques polycycliques (Maisons-Alfort).

Apostolou, I., von Boehmer, H., 2004, In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. J Exp Med 199, 1401-1408.

ATS, A.T.S., 1998, Respiratory health hazards in agriculture. Am J Respir Crit Care Med 158 : S1-S76.

Auger, E., Deslandes, V., Ramjeet, M., Contreras, I., Nash, J.H., Harel, J., Gottschalk, M., Olivier, M., Jacques, M., 2009, Host-pathogen interactions of Actinobacillus pleuropneumoniae with porcine lung and tracheal epithelial cells. Infect Immun 77, 1426-1441.

Autrup, J.L., Schmidt, J., Seremet, T., Autrup, H., 1991, Determination of exposure to aflatoxins among Danish workers in animal-feed production through the analysis of aflatoxin B1 adducts to serum albumin. Scand J Work Environ Health 17, 436-440.



Bailey, M., 2009, The mucosal immune system: recent developments and future directions in the pig. Dev Comp Immunol 33, 375-383.

Barton, G.M., Kagan, J.C., 2009, A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. Nat Rev Immunol 9, 535-542.

Battaglia, M., Gregori, S., Bacchetta, R., Roncarolo, M.G., 2006, Tr1 cells: from discovery to their clinical application. Semin Immunol 18, 120-127.

Batten, M., Groom, J., Cachero, T.G., Qian, F., Schneider, P., Tschopp, J., Browning, J.L., Mackay, F., 2000, BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. J Exp Med 192, 1453-1466.

Baumgart, D.C., Carding, S.R., 2007, Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. Lancet 369, 1627-1640.

Berek, L., Petri, I.B., Mesterhazy, A., Teren, J., Molnar, J., 2001, Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. Toxicol In Vitro 15, 25-30.

Berkes, J., Viswanathan, V.K., Savkovic, S.D., Hecht, G., 2003, Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. Gut 52, 439-451.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., Kuchroo, V.K., 2006, Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature 441, 235-238.

Bex, V., Boissier, M., Fabre, C., Meunier, O., Mouilleseaux, A., Nolard, N., OTT, Reboux, G., Robine, E., Roquebert, M. 2006. Contaminations fongiques en milieux intérieurs - Effets sur la santé respiratoire et conduites à tenir (Conseil Supérieure d'Hygiène Publique de France).

Bimczok, D., Doll, S., Rau, H., Goyarts, T., Wundrack, N., Naumann, M., Danicke, S., Rothkotter, H.J., 2007, The Fusarium toxin deoxynivalenol disrupts phenotype and function of monocyte-derived dendritic cells in vivo and in vitro. Immunobiology 212, 655-666.

Binder, E., Tan, L., Chin, L., Handl, J., Richard, J., 2007, Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. Anim. Feed Sci. Technol. 137, 265–282.

Binder E, T.L., Chin L, Handl J, Richard J, 2007, Worlwide occurence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. Anim Feed Sci Techno 137:265-282.

Black, H., Mendoza, M., Murin, S., 2007, Thoracic manifestations of inflammatory bowel disease. Chest 131, 524-532.

Bohm, J., Grajewski, J., Asperger, H., Cecon, B., Rabus, B., Razzazi, E., 2000, Study on biodegradation of some A- and B-trichothecenes and ochratoxin A by use of probiotic microorganisms. Mycotoxin Res 16 Suppl 1, 70-74.

Bondy, G.S., Pestka, J.J., 2000, Immunomodulation by fungal toxins. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 3, 109-143.

Bouhet, S., Hourcade, E., Loiseau, N., Fikry, A., Martinez, S., Roselli, M., Galtier, P., Mengheri, E., Oswald, I.P., 2004, The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. Toxicol Sci 77, 165-171.

Bouhet, S., Oswald, I.P., 2005, The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. Vet Immunol Immunopathol 108, 199-209.

Bowie, A., O'Neill, L.A., 2000, The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. J Leukoc Biol 67, 508-514.

Brand, S., Beigel, F., Olszak, T., Zitzmann, K., Eichhorst, S.T., Otte, J.M., Diepolder, H., Marquardt, A., Jagla, W., Popp, A., Leclair, S., Herrmann, K., Seiderer, J., Ochsenkuhn, T., Goke, B., Auernhammer, C.J., Dambacher, J., 2006, IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290, G827-838.

Brenchley, J.M., Paiardini, M., Knox, K.S., Asher, A.I., Cervasi, B., Asher, T.E., Scheinberg, P., Price, D.A., Hage, C.A., Kholi, L.M., Khoruts, A., Frank, I., Else, J., Schacker, T., Silvestri, G., Douek, D.C., 2008, Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. Blood 112, 2826-2835.

Brimnes, J., Allez, M., Dotan, I., Shao, L., Nakazawa, A., Mayer, L., 2005, Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. J Immunol 174, 5814-5822.

Brody, D.T., Durum, S.K., 1989, Membrane IL-1: IL-1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction. J Immunol 143, 1183-1187.

Brustle, A., Heink, S., Huber, M., Rosenplanter, C., Stadelmann, C., Yu, P., Arpaia, E., Mak, T.W., Kamradt, T., Lohoff, M., 2007, The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. Nat Immunol 8, 958-966.

Bryden, W.L., 2007, Mycotoxins in the food chain: human health implications. Asia Pac J Clin Nutr 16 Suppl 1, 95-101.

Bryden, W.L., 2012, Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. Animal Feed Sciences and Technology, 134-158.

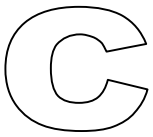
Buening, G.M., Mann, D.D., Hook, B., Osweiler, G.D., 1982, The effect of T-2 toxin on the bovine immune system: cellular factors. Vet Immunol Immunopathol 3, 411-417.

Bugarski, D., Krstic, A., Mojsilovic, S., Vlaski, M., Petakov, M., Jovcic, G., Stojanovic, N., Milenkovic, P., 2007, Signaling pathways implicated in hematopoietic progenitor cell proliferation and differentiation. Exp Biol Med (Maywood) 232, 156-163.

Buonocore, S., Ahern, P.P., Uhlig, H.H., Ivanov, II, Littman, D.R., Maloy, K.J., Powrie, F., 2010, Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. Nature 464, 1371-1375.

Burkey, T.E., Skjolaas, K.A., Dritz, S.S., Minton, J.E., 2009, Expression of porcine Toll-like receptor 2, 4 and 9 gene transcripts in the presence of lipopolysaccharide and

Salmonella enterica serovars Typhimurium and Choleraesuis. Vet Immunol Immunopathol 130, 96-101.



Caccamo, N., La Mendola, C., Orlando, V., Meraviglia, S., Todaro, M., Stassi, G., Sireci, G., Fournie, J.J., Dieli, F., Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human Vgamma9Vdelta2 T cells. Blood 118, 129-138.

Cai, G.H., Hashim, J.H., Hashim, Z., Ali, F., Bloom, E., Larsson, L., Lampa, E., Norback, D., 2011, Fungal DNA, allergens, mycotoxins and associations with asthmatic symptoms among pupils in schools from Johor Bahru, Malaysia. Pediatr Allergy Immunol 22, 290-297.

Canady, R., Coker, R., Rgan, S., Krska, R., Kuiper-Goodman, T., Olsen, M., Pestka, J., Resnik, S., Schlatter, J., 2001, Deoxynivalenol. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Additives Series 47, 420-555.

Cargill, M., Schrodi, S.J., Chang, M., Garcia, V.E., Brandon, R., Callis, K.P., Matsunami, N., Ardlie, K.G., Civello, D., Catanese, J.J., Leong, D.U., Panko, J.M., McAllister, L.B., Hansen, C.B., Papenfuss, J., Prescott, S.M., White, T.J., Leppert, M.F., Krueger, G.G., Begovich, A.B., 2007, A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. Am J Hum Genet 80, 273-290.

Carson, M.S., Smith, T.K., 1983, Role of bentonite in prevention of T-2 toxicosis in rats. J Anim Sci 57, 1498-1506.

CAST 2003. Concil for Agricultural Science and Technology, Mycotoxins - Risks in plant, animal and human systems, Report, T.F., ed. (Ames, Iowa, USA), pp. 1-191.

Casteels, K., Waer, M., Laureys, J., Valckx, D., Depovere, J., Bouillon, R., Mathieu, C., 1998, Prevention of autoimmune destruction of syngeneic islet grafts in spontaneously diabetic nonobese diabetic mice by a combination of a vitamin D3 analog and cyclosporine. Transplantation 65, 1225-1232.

Castigli, E., Scott, S., Dedeoglu, F., Bryce, P., Jabara, H., Bhan, A.K., Mizoguchi, E., Geha, R.S., 2004, Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 3903-3908.

Chamorro, S., Revilla, C., Alvarez, B., Alonso, F., Ezquerra, A., Dominguez, J., 2005, Phenotypic and functional heterogeneity of porcine blood monocytes and its relation with maturation. Immunology 114, 63-71.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., Wahl, S.M., 2003, Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. J Exp Med 198, 1875-1886.

Chen, Y., Inobe, J., Weiner, H.L., 1995, Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: both CD4+ and CD8+ cells mediate active suppression. J Immunol 155, 910-916.

Cherrier, M., Ohnmacht, C., Cording, S., Eberl, G., 2012, Development and function of intestinal innate lymphoid cells. Curr Opin Immunol 24, 277-283.

Chiba, Y., Shida, K., Nagata, S., Wada, M., Bian, L., Wang, C., Shimizu, T., Yamashiro, Y., Kiyoshima-Shibata, J., Nanno, M., Nomoto, K., 2010, Well-controlled proinflammatory cytokine responses of Peyer's patch cells to probiotic Lactobacillus casei. Immunology 130, 352-362.

Chung, Y., Chang, S.H., Martinez, G.J., Yang, X.O., Nurieva, R., Kang, H.S., Ma, L., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., Dong, C., 2009, Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. Immunity 30, 576-587.

Ciegler, A., Lillehoj, E.B., Peterson, R.E., Hall, H.H., 1966, Microbial detoxification of aflatoxin. Appl Microbiol 14, 934-939.

Ciric, B., El-behi, M., Cabrera, R., Zhang, G.X., Rostami, A., 2009, IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8+ T cells. J Immunol 182, 5296-5305.

Commission Européenne. 2013. RECOMMANDATION DE LA COMMISSION du 27 mars 2013 concernant la présence de toxines T-2 et HT-2 dans les céréales et les produits à base de céréales, 2013/165/UE, ed. (Bruxelle, Journal officiel de l'Union Européenne).

Coombes, J.L., Siddiqui, K.R., Arancibia-Carcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.M., Belkaid, Y., Powrie, F., 2007, A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. J Exp Med 204, 1757-1764.

Coquet, J.M., Kyparissoudis, K., Pellicci, D.G., Besra, G., Berzins, S.P., Smyth, M.J., Godfrey, D.I., 2007, IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production. J Immunol 178, 2827-2834.

Cottrez, F., Hurst, S.D., Coffman, R.L., Groux, H., 2000, T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. J Immunol 165, 4848-4853.

Creagh, E.M., O'Neill, L.A., 2006, TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. Trends Immunol 27, 352-357.

Creasia, D.A., Lambert, R. 1987. Acute respiratory tract toxicity of the trichothecene mycotoxin, T-2 toxin (US Army Medical Research - Institue of infectious diseases), p. 23.

Creasia, D.A., Thurman, J.D., Jones, L.J., 3rd, Nealley, M.L., York, C.G., Wannemacher, R.W., Jr., Bunner, D.L., 1987, Acute inhalation toxicity of T-2 mycotoxin in mice. Fundam Appl Toxicol 8, 230-235.

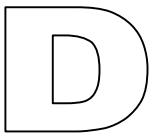
Creasia, D.A., Thurman, J.D., Wannemacher, R.W., Jr., Bunner, D.L., 1990, Acute inhalation toxicity of T-2 mycotoxin in the rat and guinea pig. Fundam Appl Toxicol 14, 54-59.

Crome, S.Q., Wang, A.Y., Levings, M.K., 2009, Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. Clin Exp Immunol 159, 109-119.

Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S.A., Gorman, D., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D., 2003, Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature 421, 744-748.

Cua, D.J., Tato, C.M., 2010, Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. Nat Rev Immunol 10, 479-489.

Curotto de Lafaille, M.A., Lafaille, J.J., 2009, Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? Immunity 30, 626-635.



Dalphin, J.C., 1996, [Chronic obstructive bronchitis in a fodder farming setting]. Rev Mal Respir 13, 575-581.

Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.C., Khoury, S., Oukka, M., Kuchroo, V.K., 2008, IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. Nat Immunol 9, 1347-1355.

Dawson, H., Solano-Aguilar, G., Beal, M., Beshah, E., Vangimalla, V., Jones, E., Botero, S., Urban, J.F., Jr., 2009, Localized Th1-, Th2-, T regulatory cell-, and inflammation-associated hepatic and pulmonary immune responses in Ascaris suum-infected swine are increased by retinoic acid. Infect Immun 77, 2576-2587.

De Nicola, D., Rebar, H., Carlon, W., 1978, T-2 toxin mycotoxicosis in the guinea pig. Food cosmet. Toxicol. 16, 601-609.

Denning, T.L., Wang, Y.C., Patel, S.R., Williams, I.R., Pulendran, B., 2007, Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. Nat Immunol 8, 1086-1094.

Dietert, R.R., 2012, Misregulated inflammation as an outcome of early-life exposure to endocrine-disrupting chemicals. Rev Environ Health 27, 117-131.

Dirix, V., Verscheure, V., Goetghebuer, T., Hainaut, M., Debrie, A.S., Locht, C., Mascart, F., 2009, Monocyte-derived interleukin-10 depresses the Bordetella pertussis- specific gamma interferon response in vaccinated infants. Clin Vaccine Immunol 16, 1816-1821.

Doisne, J.M., Soulard, V., Becourt, C., Amniai, L., Henrot, P., Havenar-Daughton, C., Blanchet, C., Zitvogel, L., Ryffel, B., Cavaillon, J.M., Marie, J.C., Couillin, I., Benlagha, K., 2011, Cutting edge: crucial role of IL-1 and IL-23 in the innate IL-17 response of peripheral lymph node NK1.1- invariant NKT cells to bacteria. J Immunol 186, 662-666.

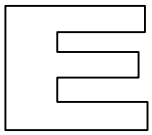
Doll, S., Schrickx, J.A., Danicke, S., Fink-Gremmels, J., 2009, Deoxynivalenol-induced cytotoxicity, cytokines and related genes in unstimulated or lipopolysaccharide stimulated primary porcine macrophages. Toxicol Lett 184, 97-106.

Dominguez-Villar, M., Hafler, D.A., 2011, Immunology. An innate role for IL-17. Science 332, 47-48.

Du, J., Huang, C., Zhou, B., Ziegler, S.F., 2008, Isoform-specific inhibition of ROR alpha-mediated transcriptional activation by human FOXP3. J Immunol 180, 4785-4792.

Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhart, A.H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., Dassopoulos, T., Bitton, A., Yang, H., Targan, S., Datta, L.W., Kistner, E.O., Schumm, L.P., Lee, A.T., Gregersen, P.K., Barmada, M.M., Rotter, J.I., Nicolae, D.L., Cho, J.H., 2006, A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. Science 314, 1461-1463.

Dugyala, R.R., Sharma, R.P., 1997, Alteration of major cytokines produced by mitogen-activated peritoneal macrophages and splenocytes in T-2 toxin-treated male CD-1 mice. Environ Toxicol Pharmacol 3, 73-81.



Eberl, G., Marmon, S., Sunshine, M.J., Rennert, P.D., Choi, Y., Littman, D.R., 2004, An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. Nat Immunol 5, 64-73.

Eduard, W., 2009, Fungal spores: a critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting. Crit Rev Toxicol 39, 799-864.

EFSA 2010. Report on trichothecenes mycotoxins HT-2 and T-2 toxins.

EFSA 2011. Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed (Parma).

El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S., Ahokas, J., 1998, Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. J Food Prot 61, 466-468.

El-Nezami, H., Polychronaki, N., Salminen, S., Mykkanen, H., 2002a, Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-Grade Lactobacillus strains with zearalenone and its derivative (')alpha-earalenol. Appl Environ Microbiol 68, 3545-3549.

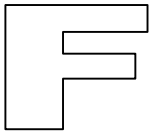
El-Nezami, H.S., Chrevatidis, A., Auriola, S., Salminen, S., Mykkanen, H., 2002b, Removal of common Fusarium toxins in vitro by strains of Lactobacillus and Propionibacterium. Food Addit Contam 19, 680-686.

Eriksen, G., Alexander, J. 1998. Fusarium toxins in cereals - a risk assessment TemaNord, ed. (Copenhangen, Nordic council of ministers).

European-commission 2003. SCOOP Taske 3.2.1. Collection of occurence data on fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of UE members states. (Belgium), pp. 1-606.

European-commission 2005. Regulation n°856/2005 (Official journal of European Union).

Ezquerra, A., Revilla, C., Alvarez, B., Perez, C., Alonso, F., Dominguez, J., 2009, Porcine myelomonocytic markers and cell populations. Dev Comp Immunol 33, 284-298.



Fagarasan, S., Honjo, T., 2003, Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. Nat Rev Immunol 3, 63-72.

FAO, 2010, Good practices for biodecurity in the pig sector. The food and agriculture organization of the United nations - animal production and health paper n°169 (ISSN 0254-6019).

Farache, J., Zigmond, E., Shakhar, G., Jung, S., 2013, Contributions of dendritic cells and macrophages to intestinal homeostasis and immune defense. Immunol Cell Biol.

Fasano, A., Shea-Donohue, T., 2005, Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2, 416-422.

Faunce, D.E., Terajewicz, A., Stein-Streilein, J., 2004, Cutting edge: in vitro-generated tolerogenic APC induce CD8+ T regulatory cells that can suppress ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 172, 1991-1995.

Fedorak, R.N., Madsen, K.L., 2004, Probiotics and the management of inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 10, 286-299.

Feldmann, M., Saklatvala, J. 2004. Proinflammatory cytokines.

Fischer, G., Muller, T., Ostrowski, R., Dott, W., 1999, Mycotoxins of Aspergillus fumigatus in pure culture and in native bioaerosols from compost facilities. Chemosphere 38, 1745-1755.

Fischer, G., Muller, T., Schwalbe, R., Ostrowski, R., Dott, W., 2000, Exposure to airborne fungi, MVOC and mycotoxins in biowaste-handling facilities. Int J Hyg Environ Health 203, 97-104.

Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y., 2005, A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. Nat Immunol 6, 1142-1151.

Forsell, J.H., Jensen, R., Tai, J.H., Witt, M., Lin, W.S., Pestka, J.J., 1987, Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol (vomitoxin) and 15-acetyldeoxynivalenol in the B6C3F1 mouse. Food Chem Toxicol 25, 155-162.

Forsyth, D.M., Yoshizawa, T., Morooka, N., Tuite, J., 1977, Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine. Appl Environ Microbiol 34, 547-552.

Fossiez, F., Banchereau, J., Murray, R., Van Kooten, C., Garrone, P., Lebecque, S., 1998, Interleukin-17. Int Rev Immunol 16, 541-551.

Friend, S.C., Hancock, D.S., Schiefer, H.B., Babiuk, L.A., 1983, Experimental T-2 toxicosis in sheep. Can J Comp Med 47, 291-297.

Fuchs, E., Binder, E.M., Heidler, D., Krska, R., 2002, Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797. Food Addit Contam 19, 379-386.

Fujimoto, K., Imaizumi, T., Yoshida, H., Takanashi, S., Okumura, K., Satoh, K., 2001, Interferon-gamma stimulates fractalkine expression in human bronchial epithelial cells and regulates mononuclear cell adherence. Am J Respir Cell Mol Biol 25, 233-238.

Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., Fujiyama, Y., 2003, Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. Gut 52, 65-70.

Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., Tsukita, S., 1994, Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. J Cell Biol 127, 1617-1626.



Gambineri, E., Torgerson, T.R., Ochs, H.D., 2003, Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. Curr Opin Rheumatol 15, 430-435.

Garden, O.A., Pinheiro, D., Cunningham, F., 2010, All creatures great and small: regulatory T cells in mice, humans, dogs and other domestic animal species. Int Immunopharmacol 11, 576-588.

Gareis, M., Meussdoerffer, F., 2000, Dust of grains and malts as a source of ochratoxin A exposure. Mycotoxin Res 16 Suppl 1, 127-130.

Garin, M.I., Chu, C.C., Golshayan, D., Cernuda-Morollon, E., Wait, R., Lechler, R.I., 2007, Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. Blood 109, 2058-2065.

Garside, P., Steel, M., Liew, F.Y., Mowat, A.M., 1995, CD4+ but not CD8+ T cells are required for the induction of oral tolerance. Int Immunol 7, 501-504.

Gauthier, T., Wang, X., Sifuentes Dos Santos, J., Fysikopoulos, A., Tadrist, S., Canlet, C., Artigot, M.P., Loiseau, N., Oswald, I.P., Puel, O., 2012, Trypacidin, a spore-borne toxin from Aspergillus fumigatus, is cytotoxic to lung cells. PLoS One 7, e29906.

Gerberick, G.F., Sorenson, W.G., 1983, Toxicity of T-2 toxin, a Fusarium mycotoxin, to alveolar macrophages in vitro. Environ Res 32, 269-285.

Gerner, W., Kaser, T., Saalmuller, A., 2009, Porcine T lymphocytes and NK cells--an update. Dev Comp Immunol 33, 310-320.

Gershon, R.K., Kondo, K., 1970, Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. Immunology 18, 723-737.

GeurtsvanKessel, C.H., Willart, M.A., van Rijt, L.S., Muskens, F., Kool, M., Baas, C., Thielemans, K., Bennett, C., Clausen, B.E., Hoogsteden, H.C., Osterhaus, A.D., Rimmelzwaan, G.F., Lambrecht, B.N., 2008, Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. J Exp Med 205, 1621-1634.

Ghanekar, S., Zheng, L., Logar, A., Navratil, J., Borowski, L., Gupta, P., Rinaldo, C., 1996, Cytokine expression by human peripheral blood dendritic cells stimulated in vitro with HIV-1 and herpes simplex virus. J Immunol 157, 4028-4036.

Girardet, C., Bonnet, M.S., Jdir, R., Sadoud, M., Thirion, S., Tardivel, C., Roux, J., Lebrun, B., Wanaverbecq, N., Mounien, L., Trouslard, J., Jean, A., Dallaporta, M., Troadec, J.D., 2011, The food-contaminant deoxynivalenol modifies eating by targeting anorexigenic neurocircuitry. PLoS One 6, e26134.

Gol-Ara, M., Jadidi-Niaragh, F., Sadria, R., Azizi, G., Mirshafiey, A., 2012, The role of different subsets of regulatory T cells in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. Arthritis 2012, 805875.

Gonzalez-Vallina, R., Wang, H., Zhan, R., Berschneider, H.M., Lee, R.M., Davidson, N.O., Black, D.D., 1996, Lipoprotein and apolipoprotein secretion by a newborn piglet intestinal cell line (IPEC-1). Am J Physiol 271, G249-259.

Goossens, J., Pasmans, F., Verbrugghe, E., Vandenbroucke, V., De Baere, S., Meyer, E., Haesebrouck, F., De Backer, P., Croubels, S., 2012, Porcine intestinal epithelial barrier disruption by the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol and T-2 toxin promotes transepithelial passage of doxycycline and paromomycin. BMC Vet Res 8, 245.

Gordon, S., 1998, The role of the macrophage in immune regulation. Res Immunol 149, 685-688.

Gordon, S., 2003, Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol 3, 23-35.

Gordon, S., Taylor, P.R., 2005, Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol 5, 953-964.

Goto, Y., Ivanov, II, 2013, Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal-host immune crosstalk. Immunol Cell Biol.

Gourbeyre, P., Desbuards, N., Gremy, G., Tranquet, O., Champ, M., Denery-Papini, S., Bodinier, M., 2013, Perinatal and Postweaning Exposure to Galactooligosaccharides/Inulin Prebiotics Induced Biomarkers Linked to Tolerance Mechanism in a Mouse Model of Strong Allergic Sensitization. J Agric Food Chem.

Grangette, C., Nutten, S., Palumbo, E., Morath, S., Hermann, C., Dewulf, J., Pot, B., Hartung, T., Hols, P., Mercenier, A., 2005, Enhanced antiinflammatory capacity of a Lactobacillus plantarum mutant synthesizing modified teichoic acids. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 10321-10326.

Grenier, B., Loureiro-Bracarense, A.P., Oswald, I.P., Mycotoxin Reduction in Grains chains: A practical Guide - Pysical and chemical methods for mycotoxins decontamination in maize Antognio F. Logrieco.

Grevier-Rames, A. 1989. Trichothécènes et guerre chimique: la guerre des rumeurs. In Thèse de pharmacie (Nancy, France).

Grossman, W.J., Ley, T.J., 2004, Granzymes A and B are not expressed in human neutrophils. Blood 104, 906-907; author reply 907-908.

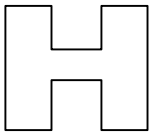
Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., Roncarolo, M.G., 1997, A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. Nature 389, 737-742.

Guillemin, G.J., Brew, B.J., 2004, Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. J Leukoc Biol 75, 388-397.

Guilloteau, P., Zabielski, R., Hammon, H.M., Metges, C.C., 2010, Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? Nutr Res Rev 23, 4-22.

Guzylack-Piriou, L., Balmelli, C., McCullough, K.C., Summerfield, A., 2004, Type-A CpG oligonucleotides activate exclusively porcine natural interferon-producing cells to secrete interferon-alpha, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-12. Immunology 112, 28-37.

Guzylack-Piriou, L., Piersma, S., McCullough, K., Summerfield, A., 2006, Role of natural interferon-producing cells and T lymphocytes in porcine monocyte-derived dendritic cell maturation. Immunology 118, 78-87.



Halstensen, A.S., Nordby, K.C., Elen, O., Eduard, W., 2004, Ochratoxin A in grain dust--estimated exposure and relations to agricultural practices in grain production. Ann Agric Environ Med 11, 245-254.

Hamann, A., Andrew, D.P., Jablonski-Westrich, D., Holzmann, B., Butcher, E.C., 1994, Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. J Immunol 152, 3282-3293.

Hameed, H., 1993, Extrusion and Chemical Treatments for destruction of Aflatoxin in Naturally-contaminated Corn. University of Arizona.

Hamilton, R.M., Trenholm, H.L., Thompson, B.K., Greenhalgh, R., 1985, The tolerance of White Leghorn and broiler chicks, and turkey poults to diets that contained deoxynivalenol (vomitoxin)-contaminated wheat. Poult Sci 64, 273-286.

Han, L., Sun, Y.Q., Fu, Q.L., Wen, W.P., Shi, J.B., 2013, [Development of allergic airway disease model in mice]. Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi 48, 224-228.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Weaver, C.T., 2005, Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol 6, 1123-1132.

Harris, T.J., Grosso, J.F., Yen, H.R., Xin, H., Kortylewski, M., Albesiano, E., Hipkiss, E.L., Getnet, D., Goldberg, M.V., Maris, C.H., Housseau, F., Yu, H., Pardoll, D.M., Drake, C.G., 2007, Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. J Immunol 179, 4313-4317.

Harvey, R.B., Kubena, L.F., Elissalde, M.H., Rottinghaus, G.E., Corrier, D.E., 1994, Administration of ochratoxin A and T-2 toxin to growing swine. Am J Vet Res 55, 1757-1761.

Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpaa, P.E., Salminen, S., Ahokas, J.T., 2001, Surface binding of aflatoxin B(1) by lactic acid bacteria. Appl Environ Microbiol 67, 3086-3091.

Hathout, A.S., Mohamed, S.R., El-Nekeety, A.A., Hassan, N.S., Aly, S.E., Abdel-Wahhab, M.A., 2011, Ability of Lactobacillus casei and Lactobacillus reuteri to protect against oxidative stress in rats fed aflatoxins-contaminated diet. Toxicon 58, 179-186.

Hayes, R.B., van Nieuwenhuize, J.P., Raatgever, J.W., ten Kate, F.J., 1984, Aflatoxin exposures in the industrial setting: an epidemiological study of mortality. Food Chem Toxicol 22, 39-43.

He, J., Zhou, T., Young, J.C., Boland, G.J., Scott, P.M., 2010, Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains. Food Science and Technology 21, 67-76.

He, P., Young, L.G., Forsberg, C., 1992, Microbial transformation of deoxynivalenol (vomitoxin). Appl Environ Microbiol 58, 3857-3863.

Himmel, M.E., Hardenberg, G., Piccirillo, C.A., Steiner, T.S., Levings, M.K., 2008, The role of T-regulatory cells and Toll-like receptors in the pathogenesis of human inflammatory bowel disease. Immunology 125, 145-153.

Hiraoka, A., Horiike, N., Akbar, S.M., Michitaka, K., Matsuyama, T., Onji, M., 2005, Soluble CD163 in patients with liver diseases: very high levels of soluble CD163 in patients with fulminant hepatic failure. J Gastroenterol 40, 52-56.

Holt, P.G., Strickland, D.H., Wikstrom, M.E., Jahnsen, F.L., 2008, Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. Nat Rev Immunol 8, 142-152.

Holtkamp, D., Kliebenstein, J., Neumann, E., Zimmerman, J., Rotto, H., Yoder, T., Wong, C., Yeske, P., Mowrer, C., Haley, A., 2012, Assessement of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. Journal of Swine Health and Production 21.

Hu, Y., Ota, N., Peng, I., Refino, C.J., Danilenko, D.M., Caplazi, P., Ouyang, W., 2010, IL-17RC is required for IL-17A- and IL-17F-dependent signaling and the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 184, 4307-4316.

Hu, Y., Shen, F., Crellin, N.K., Ouyang, W., 2011, The IL-17 pathway as a major therapeutic target in autoimmune diseases. Ann N Y Acad Sci 1217, 60-76.

Huang, F., Kao, C.Y., Wachi, S., Thai, P., Ryu, J., Wu, R., 2007, Requirement for both JAK-mediated PI3K signaling and ACT1/TRAF6/TAK1-dependent NF-kappaB activation by IL-17A in enhancing cytokine expression in human airway epithelial cells. J Immunol 179, 6504-6513.

Huber, M., Brustle, A., Reinhard, K., Guralnik, A., Walter, G., Mahiny, A., von Low, E., Lohoff, M., 2008, IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 20846-20851.

Huber, M., Heink, S., Grothe, H., Guralnik, A., Reinhard, K., Elflein, K., Hunig, T., Mittrucker, H.W., Brustle, A., Kamradt, T., Lohoff, M., 2009, A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. Eur J Immunol 39, 1716-1725.

Huston, D.P., Liu, Y.J., 2006, Thymic stromal lymphopoietin:a potential therapeutic target for allergy and asthma. Curr Allergy Asthma Rep 6, 372-376.

Hymery, N., 2006. Evaluation in vitro des effets toxiques de contaminants alimentaires sur les cellules dendritiques. Université de bretagne occidentale, France.

Hymery, N., Leon, K., Carpentier, F.G., Jung, J.L., Parent-Massin, D., 2009, T-2 toxin inhibits the differentiation of human monocytes into dendritic cells and macrophages. Toxicol In Vitro 23, 509-519.

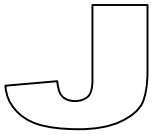
Hymery, N., Sibiril, Y., Parent-Massin, D., 2006, In vitro effects of trichothecenes on human dendritic cells. Toxicol In Vitro 20, 899-909.

Infante-Duarte, C., Horton, H.F., Byrne, M.C., Kamradt, T., 2000, Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. J Immunol 165, 6107-6115.

Insee 2013. L'état du mal-logement en France annuel, è.r., ed. (France, Fondation Abbé Pierre).

Instanes, C., Hetland, G., 2004, Deoxynivalenol (DON) is toxic to human colonic, lung and monocytic cell lines, but does not increase the IgE response in a mouse model for allergy. Toxicology 204, 13-21.

Ivanov, II, McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., Littman, D.R., 2006, The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. Cell 126, 1121-1133.



Jagadeesan, V., Rukmini, C., Vijayaraghavan, M., Tulpule, P.G., 1982, Immune studies with T-2 toxin: effect of feeding and withdrawal in monkeys. Food Chem Toxicol 20, 83-87.

Jager, A., Kuchroo, V.K., 2010, Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. Scand J Immunol 72, 173-184.

Jan, R.L., Yeh, K.C., Hsieh, M.H., Lin, Y.L., Kao, H.F., Li, P.H., Chang, Y.S., Wang, J.Y., 2011, Lactobacillus gasseri suppresses Th17 pro-inflammatory response and attenuates allergen-induced airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. Br J Nutr 108, 130-139.

JECFA 2011. Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/doc/2481.pdf

Jetten, A.M., Ueda, E., 2002, Retinoid-related orphan receptors (RORs): roles in cell survival, differentiation and disease. Cell Death Differ 9, 1167-1171.

Jiang, Q., Su, H., Knudsen, G., Helms, W., Su, L., 2006, Delayed functional maturation of natural regulatory T cells in the medulla of postnatal thymus: role of TSLP. BMC Immunol 7, 6.

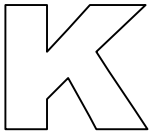
Jonuleit, H., Schmitt, E., 2003, The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. J Immunol 171, 6323-6327.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., Enk, A.H., 2000, Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. J Exp Med 192, 1213-1222.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., Enk, A.H., 2001, Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. J Exp Med 193, 1285-1294.

Joosten, S.A., Ottenhoff, T.H., 2008, Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination. Hum Immunol 69, 760-770.

Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., Littman, D.R., 2000, Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. Mol Cell Biol 20, 4106-4114.



Kabak, B., Dobson, A.D., Var, I., 2006, Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. Crit Rev Food Sci Nutr 46, 593-619.

Kang, S.G., Lim, H.W., Andrisani, O.M., Broxmeyer, H.E., Kim, C.H., 2007, Vitamin A metabolites induce gut-homing FoxP3+ regulatory T cells. J Immunol 179, 3724-3733.

Kankkunen, P., Rintahaka, J., Aalto, A., Leino, M., Majuri, M.L., Alenius, H., Wolff, H., Matikainen, S., 2009, Trichothecene mycotoxins activate inflammatory response in human macrophages. J Immunol 182, 6418-6425.

Karunasena, E., Kurkure, P.C., Lackey, R.D., McMahon, K.W., Kiernan, E.P., Graham, S., Alabady, M.S., Campos, D.L., Tatum, O.L., Brashears, M.M., 2013, Effects of the probiotic Lactobacillus animalis in murine Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection. BMC Microbiol 13, 8.

Kaser, T., Gerner, W., Hammer, S.E., Patzl, M., Saalmuller, A., 2008a, Detection of Foxp3 protein expression in porcine T lymphocytes. Vet Immunol Immunopathol 125, 92-101.

Kaser, T., Gerner, W., Hammer, S.E., Patzl, M., Saalmuller, A., 2008b, Phenotypic and functional characterisation of porcine CD4(+)CD25(high) regulatory T cells. Vet Immunol Immunopathol 122, 153-158.

Kasuga, F., Hara-Kudo, Y., Saito, N., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., 1998, In vitro effect of deoxynivalenol on the differentiation of human colonic cell lines Caco-2 and T84. Mycopathologia 142, 161-167.

Kawai, T., Akira, S., 2009, The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. International Immunology 21, 317-337.

Kawase, M., He, F., Kubota, A., harata, G., Hiramatsu, M., 2009, Clinical effects of cell preparation of *Lactobacillus* GG and *Lactobacillus gasseri* TMC0356 on perennial allergic rhinitis: a double-blind placebo-controlled trial. INt J Probio Prebio 4, 241-248.

Kawase, M., He, F., Kubota, A., Harata, G., Hiramatsu, M., 2010, Oral administration of lactobacilli from human intestinal tract protects mice against influenza virus infection. Lett Appl Microbiol 51, 6-10.

Kawashima, T., Hayashi, K., Kosaka, A., Kawashima, M., Igarashi, T., Tsutsui, H., Tsuji, N.M., Nishimura, I., Hayashi, T., Obata, A., 2011, Lactobacillus plantarum strain YU

from fermented foods activates Th1 and protective immune responses. Int Immunopharmacol 11, 2017-2024.

Kaza, S.K., McClean, S., Callaghan, M., 2010, IL-8 released from human lung epithelial cells induced by cystic fibrosis pathogens Burkholderia cepacia complex affects the growth and intracellular survival of bacteria. Int J Med Microbiol 301, 26-33.

Keely, S., Talley, N.J., Hansbro, P.M., 2012, Pulmonary-intestinal cross-talk in mucosal inflammatory disease. Mucosal Immunol 5, 7-18.

Khan, W.I., Richard, M., Akiho, H., Blennerhasset, P.A., Humphreys, N.E., Grencis, R.K., Van Snick, J., Collins, S.M., 2003, Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections. Infect Immun 71, 2430-2438.

Khare, S.D., Sarosi, I., Xia, X.Z., McCabe, S., Miner, K., Solovyev, I., Hawkins, N., Kelley, M., Chang, D., Van, G., Ross, L., Delaney, J., Wang, L., Lacey, D., Boyle, W.J., Hsu, H., 2000, Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 3370-3375.

Kim, H.Y., DeKruyff, R.H., Umetsu, D.T., 2010, The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. Nat Immunol 11, 577-584.

Kim, J.S., Jordan, M.S., 2012, Diversity of IL-17-producing T lymphocytes. Cell Mol Life Sci.

Kiros, T.G., van Kessel, J., Babiuk, L.A., Gerdts, V., 2011, Induction, regulation and physiological role of IL-17 secreting helper T-cells isolated from PBMC, thymus, and lung lymphocytes of young pigs. Vet Immunol Immunopathol 144, 448-454.

Kishimoto, T., Akira, S., Taga, T., 1992, Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. Science 258, 593-597.

Kolf-Clauw, M., Castellote, J., Joly, B., Bourges-Abella, N., Raymond-Letron, I., Pinton, P., Oswald, I.P., 2009, Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: histopathological analysis. Toxicol In Vitro 23, 1580-1584.

Kolf-Clauw, M., Sassahara, M., Lucioli, J., Rubira-Gerez, J., Alassane-Kpembi, I., Lyazhri, F., Borin, C., Oswald, I.P., 2013, The emerging mycotoxin, enniatin B1, down-modulates the gastrointestinal toxicity of T-2 toxin in vitro on intestinal epithelial cells and ex vivo on intestinal explants. Arch Toxicol.

Kolls, J.K., Linden, A., 2004, Interleukin-17 family members and inflammation. Immunity 21, 467-476.

Konstantinov, S.R., Poznanski, E., Fuentes, S., Akkermans, A.D., Smidt, H., de Vos, W.M., 2006, Lactobacillus sobrius sp. nov., abundant in the intestine of weaning piglets. Int J Syst Evol Microbiol 56, 29-32.

Konstantinov, S.R., Smidt, H., Akkermans, A.D., Casini, L., Trevisi, P., Mazzoni, M., De Filippi, S., Bosi, P., de Vos, W.M., 2008, Feeding of Lactobacillus sobrius reduces Escherichia coli F4 levels in the gut and promotes growth of infected piglets. FEMS Microbiol Ecol 66, 599-607.

Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jager, A., Strom, T.B., Oukka, M., Kuchroo, V.K., 2007, IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. Nature 448, 484-487.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. and Kuchroo, K.V, 2009, IL-17 and Th17 Cells. Annu. Rev. Immunol. 27, 485-517.

Kronenberg, M., Gapin, L., 2002, The unconventional lifestyle of NKT cells. Nat Rev Immunol 2, 557-568.

Krysinska-Traczyk, E., Kiecana, I., Perkowski, J., Dutkiewicz, J., 2001, Levels of fungi and mycotoxins in samples of grain and grain dust collected on farms in Eastern Poland. Ann Agric Environ Med 8, 269-274.

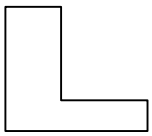
Krysinska-Traczyk, E., Perkowski, J., Dutkiewicz, J., 2007, Levels of fungi and mycotoxins in the samples of grain and grain dust collected from five various cereal crops in eastern Poland. Ann Agric Environ Med 14, 159-167.

Krysinska-Traczyk, E., Perkowski, J., Kostecki, M., Dutkiewicz, J., Kiecana, I., 2003, [Filamentous fungi and mycotoxins as potential occupational risk factors among farmers harvesting various crops]. Med Pr 54, 133-138.

Krzesicki, R.F., Winterrowd, G.E., Brashler, J.R., Hatfield, C.A., Griffin, R.L., Fidler, S.F., Kolbasa, K.P., Shull, K.L., Richards, I.M., Chin, J.E., 1997, Identification of cytokine and adhesion molecule mRNA in murine lung tissue and isolated T cells and eosinophils by semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Am J Respir Cell Mol Biol 16, 693-701.

Kuhn, D.M., Ghannoum, M.A., 2003, Indoor mold, toxigenic fungi, and Stachybotrys chartarum: infectious disease perspective. Clin Microbiol Rev 16, 144-172.

Kumar, V., 2004, Homeostatic control of immunity by TCR peptide-specific Tregs. J Clin Invest 114, 1222-1226.



Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Cua, D.J., 2005, IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. J Exp Med 201, 233-240.

Laskin, D.L., Weinberger, B., Laskin, J.D., 2001, Functional heterogeneity in liver and lung macrophages. J Leukoc Biol 70, 163-170.

Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., Shevach, E.M., O'Shea J, J., 2007, Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. Immunity 26, 371-381.

Lautraite, S., Parent-Massin, D., Rio, B., Hoellinger, H., 1995, Comparison of toxicity induced by T-2 toxin on human and rat granulo-monocytic progenitors with an in vitro model. Hum Exp Toxicol 14, 672-678.

Le Drean, G., Auffret, M., Batina, P., Arnold, F., Sibiril, Y., Arzur, D., Parent-Massin, D., 2005, Myelotoxicity of trichothecenes and apoptosis: an in vitro study on human cord blood CD34+ hematopoietic progenitor. Toxicol In Vitro 19, 1015-1024.

Lee, J.Y., Lim, Y.M., Park, M.J., Min, S.Y., Cho, M.L., Sung, Y.C., Park, S.H., Kim, H.Y., Cho, Y.G., 2008, Murine thymic stromal lymphopoietin promotes the differentiation of regulatory T cells from thymic CD4(+)CD8(-)CD25(-) naive cells in a dendritic cell-independent manner. Immunol Cell Biol 86, 206-213.

Lejeune, D., Dumoutier, L., Constantinescu, S., Kruijer, W., Schuringa, J.J., Renauld, J.C., 2002, Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. J Biol Chem 277, 33676-33682.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 1996, The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell 86, 973-983.

Lemistre, A., 2002. Les salmonelles dans les élevages porcins d'un groupement de producteurs bretons : prévalence, facteurs de risque et suivi de l'excrétion de l'élevage à l'abattoir Université Paul Sabatier - Toulouse III,

Lessard, M., 2004. Utilisation des probiotiques chez le porc - modulateurs potentiels de la santé intestinale. In: colloque de la production porcine - 25 ans d'évolution, Saint-Hyacinthe.

Levast, B., de Monte, M., Chevaleyre, C., Melo, S., Berri, M., Mangin, F., Zanello, G., Lantier, I., Salmon, H., Meurens, F., 2010, Ultra-early weaning in piglets results in low serum IgA concentration and IL17 mRNA expression. Vet Immunol Immunopathol 137, 261-268.

Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Luber, G., Kieszak, S., Nyamongo, J., Backer, L., Dahiye, A.M., Misore, A., DeCock, K., Rubin, C., 2005, Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. Environ Health Perspect 113, 1763-1767.

Li, J., Huang, Z.F., Xiong, G., Mo, H.Y., Qiu, F., Mai, H.Q., Chen, Q.Y., He, J., Chen, S.P., Zheng, L.M., Qian, C.N., Zeng, Y.X., 2011, Distribution, characterization, and induction of CD8+ regulatory T cells and IL-17-producing CD8+ T cells in nasopharyngeal carcinoma. J Transl Med 9, 189.

Li, M., Harkema, J.R., Cuff, C.F., Pestka, J.J., 2007, Deoxynivalenol exacerbates viral bronchopneumonia induced by respiratory reovirus infection. Toxicol Sci 95, 412-426.

Li, M., Harkema, J.R., Islam, Z., Cuff, C.F., Pestka, J.J., 2006, T-2 toxin impairs murine immune response to respiratory reovirus and exacerbates viral bronchiolitis. Toxicol Appl Pharmacol 217, 76-85.

Li, M., Pestka, J.J., 2008, Comparative induction of 28S ribosomal RNA cleavage by ricin and the trichothecenes deoxynivalenol and T-2 toxin in the macrophage. Toxicol Sci 105, 67-78.

Liao, L.L., Grollman, A.P., Horwitz, S.B., 1976, Mechanism of action of the 12,13-epoxytrichothecene, anguidine, an inhibitor of protein synthesis. Biochim Biophys Acta 454, 273-284.

Lider, O., Baharav, E., Mekori, Y.A., Miller, T., Naparstek, Y., Vlodavsky, I., Cohen, I.R., 1989, Suppression of experimental autoimmune diseases and prolongation of allograft survival by treatment of animals with low doses of heparins. J Clin Invest 83, 752-756.

Lievin-Le Moal, V., Amsellem, R., Servin, A.L., Coconnier, M.H., 2002, Lactobacillus acidophilus (strain LB) from the resident adult human gastrointestinal microflora exerts activity against brush border damage promoted by a diarrhoeagenic Escherichia coli in human enterocyte-like cells. Gut 50, 803-811.

Lindemann, M.D., Blodgett, D.J., Kornegay, E.T., Schurig, G.G., 1993, Potential ameliorators of aflatoxicosis in weanling/growing swine. J Anim Sci 71, 171-178.

Litinskiy, M.B., Nardelli, B., Hilbert, D.M., He, B., Schaffer, A., Casali, P., Cerutti, A., 2002, DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. Nat Immunol 3, 822-829.

Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Fazekas de St Groth, B., Clayberger, C., Soper, D.M., Ziegler, S.F., Bluestone, J.A., 2006, CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. J Exp Med 203, 1701-1711.

Liu, Y., Fatheree, N.Y., Dingle, B.M., Tran, D.Q., Rhoads, J.M., 2013a, Lactobacillus reuteri DSM 17938 changes the frequency of Foxp3+ regulatory T cells in the intestine and mesenteric lymph node in experimental necrotizing enterocolitis. PLoS One 8, e56547.

Liu, Y., Helms, C., Liao, W., Zaba, L.C., Duan, S., Gardner, J., Wise, C., Miner, A., Malloy, M.J., Pullinger, C.R., Kane, J.P., Saccone, S., Worthington, J., Bruce, I., Kwok, P.Y., Menter, A., Krueger, J., Barton, A., Saccone, N.L., Bowcock, A.M., 2008, A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci. PLoS Genet 4, e1000041.

Liu, Y., Yu, S., Li, Z., Ma, J., Zhang, Y., Wang, H., Yang, B., Wu, C., 2013b, TGF-beta Enhanced IL-21-Induced Differentiation of Human IL-21-Producing CD4(+) T Cells via Smad3. PLoS One 8, e64612.

Lochner, M., Peduto, L., Cherrier, M., Sawa, S., Langa, F., Varona, R., Riethmacher, D., Si-Tahar, M., Di Santo, J.P., Eberl, G., 2008, In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells. J Exp Med 205, 1381-1393.

Lombaert, G.A., Pellaers, P., Roscoe, V., Mankotia, M., Neil, R., Scott, P.M., 2003, Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. Food Addit Contam 20, 494-504.

Louten, J., Boniface, K., de Waal Malefyt, R., 2009, Development and function of TH17 cells in health and disease. J Allergy Clin Immunol 123, 1004-1011.

Luongo, D., Severino, L., Bergamo, P., D'Arienzo, R., Rossi, M., 2010, Trichothecenes NIV and DON modulate the maturation of murine dendritic cells. Toxicon 55, 73-80.

Ma, Y., Aymeric, L., Locher, C., Mattarollo, S.R., Delahaye, N.F., Pereira, P., Boucontet, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Casares, N., Lasarte, J.J., Matsuzaki, G., Ikuta, K., Ryffel, B., Benlagha, K., Tesniere, A., Ibrahim, N., Dechanet-Merville, J., Chaput, N., Smyth, M.J., Kroemer, G., Zitvogel, L., 2011, Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. J Exp Med 208, 491-503.

Maaser, C., Kagnoff, M.F., 2002, Role of the intestinal epithelium in orchestrating innate and adaptive mucosal immunity. Z Gastroenterol 40, 525-529.

Mackay, F., Ambrose, C., 2003, The TNF family members BAFF and APRIL: the growing complexity. Cytokine Growth Factor Rev 14, 311-324.

Mackay, F., Woodcock, S.A., Lawton, P., Ambrose, C., Baetscher, M., Schneider, P., Tschopp, J., Browning, J.L., 1999, Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. J Exp Med 190, 1697-1710.

Malek, T.R., Yu, A., Zhu, L., Matsutani, T., Adeegbe, D., Bayer, A.L., 2008, IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis. J Clin Immunol 28, 635-639.

Maloy, K.J., Kullberg, M.C., 2008, IL-23 and Th17 cytokines in intestinal homeostasis. Mucosal Immunol 1, 339-349.

Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., Weaver, C.T., 2006, Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. Nature 441, 231-234.

Maresca, M., Fantini, J., 2010, Some food-associated mycotoxins as potential risk factors in humans predisposed to chronic intestinal inflammatory diseases. Toxicon 56, 282-294.

Maresca, M., Mahfoud, R., Garmy, N., Fantini, J., 2002, The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells. J Nutr 132, 2723-2731.

Maresca, M., Yahi, N., Younes-Sakr, L., Boyron, M., Caporiccio, B., Fantini, J., 2008, Both direct and indirect effects account for the pro-inflammatory activity of enteropathogenic mycotoxins on the human intestinal epithelium: stimulation of interleukin-8 secretion, potentiation of interleukin-1beta effect and increase in the transepithelial passage of commensal bacteria. Toxicol Appl Pharmacol 228, 84-92.

Marie, J., Martel , J.L., Kobisch, M., Sanders, P., 2001, RESAPATH : Réseau de surveillance de la résistance aux antibiotiques chez les principales bactéries pathogènes des bovins, des porcs et des volailles. Epidémiol. et santé anim. 40, 51-55.

Marie, J.C., Letterio, J.J., Gavin, M., Rudensky, A.Y., 2005, TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. J Exp Med 201, 1061-1067.

Matysik, S., Herbarth, O., Mueller, A., 2008, Determination of volatile metabolites originating from mould growth on wall paper and synthetic media. J Microbiol Methods 75, 182-187.

McCullough, K.C., Basta, S., Knotig, S., Gerber, H., Schaffner, R., Kim, Y.B., Saalmuller, A., Summerfield, A., 1999, Intermediate stages in monocyte-macrophage differentiation modulate phenotype and susceptibility to virus infection. Immunology 98, 203-212.

McCullough, K.C., Schaffner, R., Natale, V., Kim, Y.B., Summerfield, A., 1997, Phenotype of porcine monocytic cells: modulation of surface molecule expression upon monocyte differentiation into macrophages. Vet Immunol Immunopathol 58, 265-275.

McDonald, K.G., McDonough, J.S., Wang, C., Kucharzik, T., Williams, I.R., Newberry, R.D., 2007, CC chemokine receptor 6 expression by B lymphocytes is essential for the development of isolated lymphoid follicles. Am J Pathol 170, 1229-1240.

McGuinness, D.H., Dehal, P.K., Pleass, R.J., 2003, Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. Trends Parasitol 19, 312-319.

Mechoud, M.A., Juarez, G.E., de Valdez, G.F., Rodriguez, A.V., 2012, Lactobacillus reuteri CRL 1098 and Lactobacillus acidophilus CRL 1014 differently reduce in vitro immunotoxic effect induced by Ochratoxin A. Food Chem Toxicol 50, 4310-4315.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A., Jr., 1997, A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature 388, 394-397.

Meissonnier, G.M., Bracarense, A.P., Bertin, G., Galtier, P., Oswald, I.P., 2008, Toxic properties of type-A trichothecenes in farm animals.

Meissonnier, G.M., Raymond, I., Laffitte, J., Cossalter, A.M., Pinton, P., Benoit, E., Bertin, G., Galtier, P., Oswald, I.P., 2009, Dietary glucomannan improves the vaccinal response in pigs exposed to aflatoxin B-1 or T-2 toxin. World Mycotoxin Journal 2, 161-172.

Meister, U.a.S., M. , 2004, Mycotoxins in cereals and cereals products-occurence and chages during processing. J Appl.Bol.Food.Qual 78, 168-173.

Meky, F.A., Hardie, L.J., Evans, S.W., Wild, C.P., 2001, Deoxynivalenol-induced immunomodulation of human lymphocyte proliferation and cytokine production. Food Chem Toxicol 39, 827-836.

Mellor, A.L., Munn, D.H., 2004, IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. Nat Rev Immunol 4, 762-774.

Menard, S., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M., 2010, Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. Mucosal Immunol 3, 247-259.

Merchant, J.A., 1987, Agricultural exposures to organic dusts. Occup Med 2, 409-425.

Messaoudi, S., Madi, A., Prevost, H., Feuilloley, M., Manai, M., Dousset, X., Connil, N., 2012, In vitro evaluation of the probiotic potential of Lactobacillus salivarius SMXD51. Anaerobe 18, 584-589.

Meurens, F., Berri, M., Auray, G., Melo, S., Levast, B., Virlogeux-Payant, I., Chevaleyre, C., Gerdts, V., Salmon, H., 2009, Early immune response following Salmonella enterica subspecies enterica serovar Typhimurium infection in porcine jejunal gut loops. Vet Res 40, 5.

Micci, L., Cervasi, B., Ende, Z.S., Iriele, R.I., Reyes-Aviles, E., Vinton, C., Else, J., Silvestri, G., Ansari, A.A., Villinger, F., Pahwa, S., Estes, J.D., Brenchley, J.M., Paiardini, M., 2012, Paucity of IL-21-producing CD4(+) T cells is associated with Th17 cell depletion in SIV infection of rhesus macaques. Blood 120, 3925-3935.

Miller, E.R., Ullrey, D.E., 1987, The pig as a model for human nutrition. Annu Rev Nutr 7, 361-382.

Mills, K.H., 2004, Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? Nat Rev Immunol 4, 841-855.

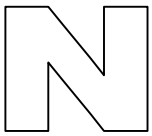
Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Artis, D., 2012, Innate lymphoid cells: critical regulators of allergic inflammation and tissue repair in the lung. Curr Opin Immunol 24, 284-289.

Moore, P.A., Belvedere, O., Orr, A., Pieri, K., LaFleur, D.W., Feng, P., Soppet, D., Charters, M., Gentz, R., Parmelee, D., Li, Y., Galperina, O., Giri, J., Roschke, V., Nardelli, B., Carrell, J., Sosnovtseva, S., Greenfield, W., Ruben, S.M., Olsen, H.S., Fikes, J., Hilbert, D.M., 1999, BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. Science 285, 260-263.

Mosmann, T.R., Sad, S., 1996, The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol Today 17, 138-146.

Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., Cheroutre, H., 2007, Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. Science 317, 256-260.

Murai, M., Turovskaya, O., Kim, G., Madan, R., Karp, C.L., Cheroutre, H., Kronenberg, M., 2009, Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. Nat Immunol 10, 1178-1184.



Naaber, P., Smidt, I., Stsepetova, J., Brilene, T., Annuk, H., Mikelsaar, M., 2004, Inhibition of Clostridium difficile strains by intestinal Lactobacillus species. J Med Microbiol 53, 551-554.

Nagata, T., Suzuki, H., Ishigami, N., Shinozuka, J., Uetsuka, K., Nakayama, H., Doi, K., 2001, Development of apoptosis and changes in lymphocyte subsets in thymus, mesenteric lymph nodes and Peyer's patches of mice orally inoculated with T-2 toxin. Exp Toxicol Pathol 53, 309-315.

Nascimbeni, M., Shin, E.C., Chiriboga, L., Kleiner, D.E., Rehermann, B., 2004, Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. Blood 104, 478-486.

Navarre, W.W., Schneewind, O., 1999, Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. Microbiol Mol Biol Rev 63, 174-229.

Ndhlovu, L.C., Takeda, I., Sugamura, K., Ishii, N., 2004, Expanding role of T-cell costimulators in regulatory T-cell function: recent advances in accessory molecules expressed on both regulatory and nonregulatory T cells. Crit Rev Immunol 24, 251-266.

Neurath, M.F., Finotto, S., Glimcher, L.H., 2002, The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. Nat Med 8, 567-573.

Ng, L.G., Mackay, C.R., Mackay, F., 2005, The BAFF/APRIL system: life beyond B lymphocytes. Mol Immunol 42, 763-772.

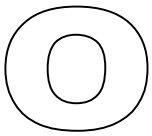
Nicoletti, C., Arques, J.L., Bertelli, E., 2010, CX(3)CR1 is critical for Salmonella-induced migration of dendritic cells into the intestinal lumen. Gut Microbes 1, 131-134.

Niedzwiedzka-Rystwej, P., Tokarz-Deptula, B., Deptula, W., 2013, Characteristics of T lymphocyte subpopulations. Postepy Hig Med Dosw (Online) 67, 371-379.

Nordby, K.C., Halstensen, A.S., Elen, O., Clasen, P.E., Langseth, W., Kristensen, P., Eduard, W., 2004, Trichothecene mycotoxins and their determinants in settled dust related to grain production. Ann Agric Environ Med 11, 75-83.

Norred, W.P., Morrissey, R.E., 1983, Effects of long-term feeding of ammoniated, aflatoxin-contaminated corn to Fischer 344 rats. Toxicol Appl Pharmacol 70, 96-104.

Nurieva, R., Yang, X.O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A.D., Ma, L., Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Dong, C., 2007, Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. Nature 448, 480-483.



O'Neill, L.A., 2006, How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. Curr Opin Immunol 18, 3-9.

Ohkawara, T., Nishihira, J., Takeda, H., Asaka, M., Sugiyama, T., 2005, Pathophysiological roles of macrophage migration inhibitory factor in gastrointestinal, hepatic, and pancreatic disorders. J Gastroenterol 40, 117-122.

Oswald, I.P., 2006, Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine. Vet Res 37, 359-368.

Oswald, I.P., Comera, C., 1998, Immunotoxicity of mycotoxins. Revue Méd. Vét. 149, 585-590.

Oswald, I.P., Marin, D.E., Bouhet, S., Pinton, P., Taranu, I., Accensi, F., 2005, Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. Food Addit Contam 22, 354-360.

Ouyang, W., Kolls, J.K., Zheng, Y., 2008, The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. Immunity 28, 454-467.

Ouyang, W., Valdez, P., 2008, IL-22 in mucosal immunity. Mucosal Immunol 1, 335-338.

Pandolfi, F., Cianci, R., Pagliari, D., Landolfi, R., Cammarota, G., 2009, Cellular mediators of inflammation: tregs and TH17 cells in gastrointestinal diseases. Mediators Inflamm 2009, 132028.

Pang, V.F., Adams, J.H., Beasley, V.R., Buck, W.B., Haschek, W.M., 1986, Myocardial and pancreatic lesions induced by T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin, in swine. Vet Pathol 23, 310-319.

Pang, V.F., Lambert, R.J., Felsburg, P.J., Beasley, V.R., Buck, W.B., Haschek, W.M., 1987a, Experimental T-2 toxicosis in swine following inhalation exposure: effects on pulmonary and systemic immunity, and morphologic changes. Toxicol Pathol 15, 308-319.

Pang, V.F., Lambert, R.J., Felsburg, P.J., Beasley, V.R., Buck, W.B., Haschek, W.M., 1988, Experimental T-2 toxicosis in swine following inhalation exposure: clinical signs and effects on hematology, serum biochemistry, and immune response. Fundam Appl Toxicol 11, 100-109.

Pang, V.F., Lorenzana, R.M., Beasley, V.R., Buck, W.B., Haschek, W.M., 1987b, Experimental T-2 toxicosis in swine. III. Morphologic changes following intravascular administration of T-2 toxin. Fundam Appl Toxicol 8, 298-309.

Pang, V.F., Swanson, S.P., Beasley, V.R., Buck, W.B., Haschek, W.M., 1987c, The toxicity of T-2 toxin in swine following topical application. I. Clinical signs, pathology, and residue concentrations. Fundam Appl Toxicol 9, 41-49.

Parent-Massin, D., 2004, Haematotoxicity of trichothecenes. Toxicol Lett 153, 75-81.

Park, D.L., Rua, S.M., Jr., Mirocha, C.J., Abd-Alla, E.S., Weng, C.Y., 1992, Mutagenic potentials of fumonisin contaminated corn following ammonia decontamination procedure. Mycopathologia 117, 105-108.

Parrish-Novak, J., Dillon, S.R., Nelson, A., Hammond, A., Sprecher, C., Gross, J.A., Johnston, J., Madden, K., Xu, W., West, J., Schrader, S., Burkhead, S., Heipel, M., Brandt, C., Kuijper, J.L., Kramer, J., Conklin, D., Presnell, S.R., Berry, J., Shiota, F., Bort, S., Hambly, K., Mudri, S., Clegg, C., Moore, M., Grant, F.J., Lofton-Day, C., Gilbert, T., Rayond, F., Ching, A., Yao, L., Smith, D., Webster, P., Whitmore, T., Maurer, M., Kaushansky, K., Holly, R.D., Foster, D., 2000, Interleukin 21 and its receptor are

involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. Nature 408, 57-63.

Peaudecerf, L., Rocha, B., 2010, Role of the gut as a primary lymphoid organ. Immunol Lett 140, 1-6.

Pedrosa, K., Schatzmayr, D., Jans, D., Bertin, G., Grenier, B., 2010, Mycotoxin reduction in animals - adsorption and biological detoxification Logrieco, A.F. Edition.

Peltonen, K., el-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J., Salminen, S., 2001, Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. J Dairy Sci 84, 2152-2156.

Pestka, J., Zhou, H.R., 2006, Toll-like receptor priming sensitizes macrophages to proinflammatory cytokine gene induction by deoxynivalenol and other toxicants. Toxicol Sci 92, 445-455.

Pestka, J.J., Smolinski, A.T., 2005, Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 8, 39-69.

Pestka, J.J., Zhou, H.R., Moon, Y., Chung, Y.J., 2004, Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. Toxicol Lett 153, 61-73.

Peterson, R.A., 2012, Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. Toxicol Pathol 40, 186-204.

Philip, N.H., Artis, D., 2013, New friendships and old feuds: relationships between innate lymphoid cells and microbial communities. Immunol Cell Biol.

Pieper, C., Pieloch, P., Galla, H.J., 2013, Pericytes support neutrophil transmigration via interleukin-8 across a porcine co-culture model of the blood-brain barrier. Brain Res.

Pier, A.C., Richard, J.L., Cysewski, S.J., 1980, Implications of mycotoxins in animal disease. J Am Vet Med Assoc 176, 719-724.

Pinton, P., Braicu, C., Nougayrede, J.P., Laffitte, J., Taranu, I., Oswald, I.P., 2010, Deoxynivalenol impairs porcine intestinal barrier function and decreases the protein expression of claudin-4 through a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. J Nutr 140, 1956-1962.

Pinton, P., Guzylack-Piriou, L., Kolf-Clauw, M., Oswald, I.P. 2011. Effects of some fungal toxins, the trichothecenes, on the epithelial intestinal barrier.

Pinton, P., Guzylack-Piriou, L., Kolf-Clauw, M., Oswald, I.P., 2012a, The effect on the intestine of some fungal toxins : the trichothecenes. curr Immunol Rev 8, 193-208.

Pinton, P., Nougayrede, J.P., Del Rio, J.C., Moreno, C., Marin, D.E., Ferrier, L., Bracarense, A.P., Kolf-Clauw, M., Oswald, I.P., 2009, The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. Toxicol Appl Pharmacol 237, 41-48.

Pinton, P., Tsybulskyy, D., Lucioli, J., Laffitte, J., Callu, P., Lyazhri, F., Grosjean, F., Bracarense, A.P., Kolf-Clauw, M., Oswald, I.P., 2012b, Toxicity of deoxynivalenol and its acetylated derivatives on the intestine: differential effects on morphology, barrier function, tight junction proteins, and mitogen-activated protein kinases. Toxicol Sci 130, 180-190.

Piriou-Guzylack, L., Salmon, H., 2008, Membrane markers of the immune cells in swine: an update. Vet Res 39, 54.

Plantinga, M., Hammad, H., Lambrecht, B.N., 2010, Origin and functional specializations of DC subsets in the lung. Eur J Immunol 40, 2112-2118.

Proud, D., Leigh, R., 2011, Epithelial cells and airway diseases. Immunol Rev 242, 186-204.

Puel, A., Cypowyj, S., Bustamante, J., Wright, J.F., Liu, L., Lim, H.K., Migaud, M., Israel, L., Chrabieh, M., Audry, M., Gumbleton, M., Toulon, A., Bodemer, C., El-Baghdadi, J., Whitters, M., Paradis, T., Brooks, J., Collins, M., Wolfman, N.M., Al-Muhsen, S., Galicchio, M., Abel, L., Picard, C., Casanova, J.L., 2011, Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. Science 332, 65-68.

Q

Quintana, F.J., Basso, A.S., Iglesias, A.H., Korn, T., Farez, M.F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., Weiner, H.L., 2008, Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. Nature 453, 65-71.

R

Rachitskaya, A.V., Hansen, A.M., Horai, R., Li, Z., Villasmil, R., Luger, D., Nussenblatt, R.B., Caspi, R.R., 2008, Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and RORgammat and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. J Immunol 180, 5167-5171.

Reddy, N.B., Devegowda, G., Girish, C.K., 2003, Modified glucomannan: a promising solution to bind T-2 toxin in broilers. Feed technology 8, 23-24.

Reibman, J., Hsu, Y., Chen, L.C., Bleck, B., Gordon, T., 2003, Airway epithelial cells release MIP-3alpha/CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. Am J Respir Cell Mol Biol 28, 648-654.

Ribot, J.C., deBarros, A., Pang, D.J., Neves, J.F., Peperzak, V., Roberts, S.J., Girardi, M., Borst, J., Hayday, A.C., Pennington, D.J., Silva-Santos, B., 2009, CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. Nat Immunol 10, 427-436.

Rimaniol, A.C., Till, S.J., Garcia, G., Capel, F., Godot, V., Balabanian, K., Durand-Gasselin, I., Varga, E.M., Simonneau, G., Emilie, D., Durham, S.R., Humbert, M., 2003, The CX3C chemokine fractalkine in allergic asthma and rhinitis. J Allergy Clin Immunol 112, 1139-1146.

Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P., Rescigno, M., 2005, Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. Nat Immunol 6, 507-514.

Rio, B., Lautraite, S., Parent-Massin, D., 1997, In vitro toxicity of trichothecenes on human erythroblastic progenitors. Hum Exp Toxicol 16, 673-679.

Rivollier, A., He, J., Kole, A., Valatas, V., Kelsall, B.L., 2012, Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. J Exp Med 209, 139-155.

Roark, C.L., Simonian, P.L., Fontenot, A.P., Born, W.K., O'Brien, R.L., 2008, gammadelta T cells: an important source of IL-17. Curr Opin Immunol 20, 353-357.

Roberts, A.B., 1998, Molecular and cell biology of TGF-beta. Miner Electrolyte Metab 24, 111-119.

Rocha, O., Ansari, K., Doohan, F.M., 2005, Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. Food Addit Contam 22, 369-378.

Romagnani, S., 1991, Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. Immunol Today 12, 256-257.

Roncarolo, M.G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., Levings, M.K., 2006, Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. Immunol Rev 212, 28-50.

Roselli, M., Finamore, A., Britti, M.S., Konstantinov, S.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Mengheri, E., 2007, The novel porcine Lactobacillus sobrius strain protects intestinal cells from enterotoxigenic Escherichia coli K88 infection and prevents membrane barrier damage. J Nutr 137, 2709-2716.

Rothkotter, H.J., Sowa, E., Pabst, R., 2002, The pig as a model of developmental immunology. Hum Exp Toxicol 21, 533-536.

Rotter, B.A., Prelusky, D.B., Pestka, J.J., 1996, Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). J Toxicol Environ Health 48, 1-34.

Rotter, B.A., Thompson, B.K., Lessard, M., Trenholm, H.L., Tryphonas, H., 1994, Influence of low-level exposure to Fusarium mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine. Fundam Appl Toxicol 23, 117-124.

Rouvier, E., Luciani, M.F., Mattei, M.G., Denizot, F., Golstein, P., 1993, CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. J Immunol 150, 5445-5456.

Rylander, R., 1994, Organic dusts--from knowledge to prevention. Scand J Work Environ Health 20 Spec No, 116-122.



Saenz, S.A., Taylor, B.C., Artis, D., 2008, Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. Immunol Rev 226, 172-190.

Sakaguchi, S., 2000, Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. Cell 101, 455-458.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M., 1995, Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol 155, 1151-1164.

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., 2008, Regulatory T cells and immune tolerance. Cell 133, 775-787.

Samoilova, E.B., Horton, J.L., Hilliard, B., Liu, T.S., Chen, Y., 1998, IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. J Immunol 161, 6480-6486.

Sanchez, A.M., Zhu, J., Huang, X., Yang, Y., 2012, The development and function of memory regulatory T cells after acute viral infections. J Immunol 189, 2805-2814.

Sang, Y., Yang, J., Ross, C.R., Rowland, R.R., Blecha, F., 2008, Molecular identification and functional expression of porcine Toll-like receptor (TLR) 3 and TLR7. Vet Immunol Immunopathol 125, 162-167.

Satoh-Takayama, N., Dumoutier, L., Lesjean-Pottier, S., Ribeiro, V.S., Mandelboim, O., Renauld, J.C., Vosshenrich, C.A., Di Santo, J.P., 2009, The natural cytotoxicity receptor NKp46 is dispensable for IL-22-mediated innate intestinal immune defense against Citrobacter rodentium. J Immunol 183, 6579-6587.

Satoh-Takayama, N., Vosshenrich, C.A., Lesjean-Pottier, S., Sawa, S., Lochner, M., Rattis, F., Mention, J.J., Thiam, K., Cerf-Bensussan, N., Mandelboim, O., Eberl, G., Di Santo, J.P., 2008, Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. Immunity 29, 958-970.

Schell, T.C., Lindemann, M.D., Kornegay, E.T., Blodgett, D.J., Doerr, J.A., 1993, Effectiveness of different types of clay for reducing the detrimental effects of aflatoxin-contaminated diets on performance and serum profiles of weanling pigs. J Anim Sci 71, 1226-1231.

Schmale III, D., Munkvold, G., 2009, Mycotoxins in crops: A threat to human and domestic animal health. The plant health instructor.

Schneider, P., MacKay, F., Steiner, V., Hofmann, K., Bodmer, J.L., Holler, N., Ambrose, C., Lawton, P., Bixler, S., Acha-Orbea, H., Valmori, D., Romero, P., Werner-Favre, C., Zubler, R.H., Browning, J.L., Tschopp, J., 1999, BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. J Exp Med 189, 1747-1756.

Schuerer-Maly, C.C., Eckmann, L., Kagnoff, M.F., Falco, M.T., Maly, F.E., 1994, Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. Immunology 81, 85-91.

Schultz, M., 2008, Clinical use of E. coli Nissle 1917 in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 14, 1012-1018.

Schutze, N., Lehmann, I., Bonisch, U., Simon, J.C., Polte, T., 2010, Exposure to mycotoxins increases the allergic immune response in a murine asthma model. Am J Respir Crit Care Med 181, 1188-1199.

Scott, C.L., Aumeunier, A.M., Mowat, A.M., 2011, Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance? Trends Immunol 32, 412-419.

Scott, P.M. 1986. Potential indoor air pollution problems with macrocyclic trichothecene by producing fungi. (Ottawa, Canada., Environmental Health Directorate Health and Welfare).

Sebastiani, S., Allavena, P., Albanesi, C., Nasorri, F., Bianchi, G., Traidl, C., Sozzani, S., Girolomoni, G., Cavani, A., 2001, Chemokine receptor expression and function in CD4+ T lymphocytes with regulatory activity. J Immunol 166, 996-1002.

Seder, R.A., Marth, T., Sieve, M.C., Strober, W., Letterio, J.J., Roberts, A.B., Kelsall, B., 1998, Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4+ T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production. J Immunol 160, 5719-5728.

Seeboth, J., Cano, P.M., Meurens, F., Cognie, J., Abrami, R., Oswald, I.P., Guzylack-Piriou, L., 2013, Deoxynivalenol as a New Factor in the Persistence of Intestinal Inflammatory Diseases: An Emerging Hypothesis through Possible Modulation of Th17-Mediated Response. PLoS One 8, e53647.

Seeboth, J., Solinhac, R., Oswald, I.P., Guzylack-Piriou, L., 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. Vet Res 43, 35.

Shalev, I., Wong, K.M., Foerster, K., Zhu, Y., Chan, C., Maknojia, A., Zhang, J., Ma, X.Z., Yang, X.C., Gao, J.F., Liu, H., Selzner, N., Clark, D.A., Adeyi, O., Phillips, M.J., Gorczynski, R.R., Grant, D., McGilvray, I., Levy, G., 2009, The novel CD4+CD25+ regulatory T cell effector molecule fibrinogen-like protein 2 contributes to the outcome of murine fulminant viral hepatitis. Hepatology 49, 387-397.

Shevach, E.M., 2000, Regulatory T cells in autoimmmunity*. Annu Rev Immunol 18, 423-449.

Silva, W.A., Jr., Covas, D.T., Panepucci, R.A., Proto-Siqueira, R., Siufi, J.L., Zanette, D.L., Santos, A.R., Zago, M.A., 2003, The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells 21, 661-669.

Smelt, M.J., de Haan, B.J., Bron, P.A., van Swam, I., Meijerink, M., Wells, J.M., Faas, M.M., de Vos, P., 2012, L. plantarum, L. salivarius, and L. lactis attenuate Th2 responses and increase Treg frequencies in healthy mice in a strain dependent manner. PLoS One 7, e47244.

Smith, T.R., Kumar, V., 2008, Revival of CD8+ Treg-mediated suppression. Trends Immunol 29, 337-342.

Smoragiewicz, W., Cossette, B., Boutard, A., Krzystyniak, K., 1993, Trichothecene mycotoxins in the dust of ventilation systems in office buildings. Int Arch Occup Environ Health 65, 113-117.

Sonnenberg, G.F., Monticelli, L.A., Elloso, M.M., Fouser, L.A., Artis, D., 2011, CD4(+) lymphoid tissue-inducer cells promote innate immunity in the gut. Immunity 34, 122-134.

Sorenson, W.G., 1999, Fungal spores: hazardous to health? Environ Health Perspect 107 Suppl 3, 469-472.

Sorenson, W.G., Gerberick, G.F., Lewis, D.M., Castranova, V., 1986, Toxicity of mycotoxins for the rat pulmonary macrophage in vitro. Environ Health Perspect 66, 45-53.

Soumelis, V., Volpe, E., 2008, [TH17 differentiation, a complex process in mouse and man]. Med Sci (Paris) 24, 925-927.

Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N., Mebius, R.E., Powrie, F., Vivier, E., 2013, Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. Nat Rev Immunol 13, 145-149.

Spits, H., Di Santo, J.P., 2010, The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. Nat Immunol 12, 21-27.

Spolski, R., Leonard, W.J., 2008a, Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. Annu Rev Immunol 26, 57-79.

Spolski, R., Leonard, W.J., 2008b, The Yin and Yang of interleukin-21 in allergy, autoimmunity and cancer. Curr Opin Immunol 20, 295-301.

Stanley, V.G., Ojo, R., Woldesenbet, S., Hutchinson, D.H., Kubena, L.F., 1993, The use of Saccharomyces cerevisiae to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. Poult Sci 72, 1867-1872.

Stanley, V.G., Winsman, M., Dunkley, C., Ogunleye, T., Daley, M., Krueger, W.F., Sefton, A.E., Hinton, A., 2004, The impact of yeast culture residue on the suppression of diatery aflatoxin on the performance of broiler breeder hens. Journal of Applied Poultry Research 13, 533-539.

Stepanova, H., Mensikova, M., Chlebova, K., Faldyna, M., 2012, CD4+ and gammadeltaTCR+ T lymphocytes are sources of interleukin-17 in swine. Cytokine 58, 152-157.

Stepanova, H., Samankova, P., Leva, L., Sinkora, J., Faldyna, M., 2007, Early postnatal development of the immune system in piglets: the redistribution of T lymphocyte subsets. Cell Immunol 249, 73-79.

Stockinger, B., Veldhoen, M., 2007, Differentiation and function of Th17 T cells. Curr Opin Immunol 19, 281-286.

Stout, R.D., Suttles, J., 2004, Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. J Leukoc Biol 76, 509-513.

Strober, W., 2010, The LTi cell, an immunologic chameleon. Immunity 33, 650-652.

Styriak, I., Conkova, E., Kmec, V., Bohm, J., Razzazi, E., 2001, The use of yeast for microbial degradation of some selected mycotoxins. Mycotoxin Res 17 Suppl 1, 24-27.

Sugimoto, K., Ogawa, A., Mizoguchi, E., Shimomura, Y., Andoh, A., Bhan, A.K., Blumberg, R.S., Xavier, R.J., Mizoguchi, A., 2008, IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. J Clin Invest 118, 534-544.

Sugiyama, K., Muroi, M., Tanamoto, K., Nishijima, M., Sugita-Konishi, Y., 2010, Deoxynivalenol and nivalenol inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by mouse macrophage cells. Toxicol Lett 192, 150-154.

Summerfield, A., McCullough, K.C., 2009, The porcine dendritic cell family. Dev Comp Immunol 33, 299-309.

Sun, C.M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., Belkaid, Y., 2007, Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. J Exp Med 204, 1775-1785.

Sutherland, A.P., Mackay, F., Mackay, C.R., 2006, Targeting BAFF: immunomodulation for autoimmune diseases and lymphomas. Pharmacol Ther 112, 774-786.

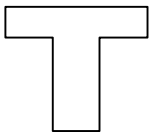
Sutton, C.E., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Brereton, C.F., Lavelle, E.C., Mills, K.H., 2009, Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. Immunity 31, 331-341.

Sutton, C.E., Mielke, L.A., Mills, K.H., 2012, IL-17-producing gammadelta T cells and innate lymphoid cells. Eur J Immunol 42, 2221-2231.

Szajewska, H., Kotowska, M., Mrukowicz, J.Z., Armanska, M., Mikolajczyk, W., 2001, Efficacy of Lactobacillus GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. J Pediatr 138, 361-365.

Szajewska, H., Mrukowicz, J.Z., 2001, Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published

randomized, double-blind, placebo-controlled trials. J Pediatr Gastroenterol Nutr 33 Suppl 2, S17-25.



Taams, L.S., Palmer, D.B., Akbar, A.N., Robinson, D.S., Brown, Z., Hawrylowicz, C.M., 2006, Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. Immunology 118, 1-9.

Tai, J.H., Pestka, J.J., 1990, T-2 toxin impairment of murine response to Salmonella typhimurium: a histopathologic assessment. Mycopathologia 109, 149-155.

Takeda, K., Akira, S., 2005, Toll-like receptors in innate immunity. Int Immunol 17, 1-14.

Tan, Y., Li, Y., Liu, D., Zhong, L., 2013, Suplatast tosilate ameliorates airway hyperreactivity and inflammation through inhibition of the GATA3/IL5 signaling pathway in asthmatic rats. Mol Med Rep 8, 161-167.

Taylor, P.R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.H., Brown, G.D., Gordon, S., 2005, Macrophage receptors and immune recognition. Annu Rev Immunol 23, 901-944.

Tennakoon, D.K., Mehta, R.S., Ortega, S.B., Bhoj, V., Racke, M.K., Karandikar, N.J., 2006, Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8+ T cells in multiple sclerosis. J Immunol 176, 7119-7129.

Tessarz, A.S., Cerwenka, A., 2008, The TREM-1/DAP12 pathway. Immunol Lett 116, 111-116.

Thurman, J.D., Creasia, D.A., Trotter, R.W., 1988, Mycotoxicosis caused by aerosolized T-2 toxin administered to female mice. Am J Vet Res 49, 1928-1931.

Toumi, R., Abdelouhab, K., Rafa, H., Soufli, I., Raissi-Kerboua, D., Djeraba, Z., Touil-Boukoffa, C., 2013, Beneficial role of the probiotic mixture Ultrabiotique on maintaining the integrity of intestinal mucosal barrier in DSS-induced experimental colitis. Immunopharmacol Immunotoxicol. 35, 403-409.

Trenholm, H.L., Charmley, L.L., Prelusky, D.B., Warner, R.M., 1991, 2 physical methods for the decontamination of 4 cereals contamined with deoxynivalenol and zearalenone. Journal of Agricultural and Food Chemistry 39, 356-360.

Trenholm, H.L., Hamilton, R.M., Friend, D.W., Thompson, B.K., Hartin, K.E., 1984, Feeding trials with vomitoxin (deoxynivalenol)-contaminated wheat: effects on swine, poultry, and dairy cattle. J Am Vet Med Assoc 185, 527-531.

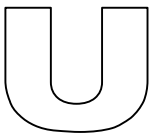
Trinchieri, G., Sher, A., 2007, Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. Nat Rev Immunol 7, 179-190.

Trucksess, M.W., Thomas, F., Young, K., Stack, M.E., Fulgueras, W.J., Page, S.W., 1995, Survey of deoxynivalenol in U.S. 1993 wheat and barley crops by enzyme-linked immunosorbent assay. J AOAC Int 78, 631-636.

Tsukita, S., Furuse, M., Itoh, M., 2001, Multifunctional strands in tight junctions. Nat Rev Mol Cell Biol 2, 285-293.

Tuomi, T., Reijula, K., Johnsson, T., Hemminki, K., Hintikka, E.L., Lindroos, O., Kalso, S., Koukila-Kahkola, P., Mussalo-Rauhamaa, H., Haahtela, T., 2000, Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. Appl Environ Microbiol 66, 1899-1904.

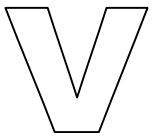
Turner-Warwick, M., 1968, Fibrosing alveolitis and chronic liver disease. Q J Med 37, 133-149.



Ueno, Y., 1984, Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes. Fundam Appl Toxicol 4, S124-132.

Uhlig, H.H., McKenzie, B.S., Hue, S., Thompson, C., Joyce-Shaikh, B., Stepankova, R., Robinson, N., Buonocore, S., Tlaskalova-Hogenova, H., Cua, D.J., Powrie, F., 2006, Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. Immunity 25, 309-318.

Uss, E., Rowshani, A.T., Hooibrink, B., Lardy, N.M., van Lier, R.A., ten Berge, I.J., 2006, CD103 is a marker for alloantigen-induced regulatory CD8+ T cells. J Immunol 177, 2775-2783.



van de Veerdonk, F.L., Gresnigt, M.S., Kullberg, B.J., van der Meer, J.W., Joosten, L.A., Netea, M.G., 2009, Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. BMB Rep 42, 776-787.

Van Itallie, C.M., Anderson, J.M., 2006, Claudins and epithelial paracellular transport. Annu Rev Physiol 68, 403-429.

van Rijt, L.S., Jung, S., Kleinjan, A., Vos, N., Willart, M., Duez, C., Hoogsteden, H.C., Lambrecht, B.N., 2005, In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. J Exp Med 201, 981-991.

Vandenbroucke, V., Croubels, S., Martel, A., Verbrugghe, E., Goossens, J., Van Deun, K., Boyen, F., Thompson, A., Shearer, N., De Backer, P., Haesebrouck, F., Pasmans, F., 2011, The mycotoxin deoxynivalenol potentiates intestinal inflammation by Salmonella typhimurium in porcine ileal loops. PLoS One 6, e23871.

Vandenbroucke, V., Croubels, S., Verbrugghe, E., Boyen, F., De Backer, P., Ducatelle, R., Rychlik, I., Haesebrouck, F., Pasmans, F., 2009, The mycotoxin deoxynivalenol promotes uptake of Salmonella Typhimurium in porcine macrophages, associated with ERK1/2 induced cytoskeleton reorganization. Vet Res 40, 64.

Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A.M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J.C., Stockinger, B., 2008, The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. Nature 453, 106-109.

Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., Stockinger, B., 2006a, TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. Immunity 24, 179-189.

Veldhoen, M., Hocking, R.J., Flavell, R.A., Stockinger, B., 2006b, Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. Nat Immunol 7, 1151-1156.

Verbrugghe, E., Croubels, S., Vandenbroucke, V., Goossens, J., De Backer, P., Eeckhout, M., De Saeger, S., Boyen, F., Leyman, B., Van Parys, A., Haesebrouck, F., Pasmans, F., 2012, A modified glucomannan mycotoxin-adsorbing agent counteracts the reduced weight gain and diminishes cecal colonization of Salmonella Typhimurium in T-2 toxin exposed pigs. Res Vet Sci 93, 1139-1141.

Vesonder, R.F., Ciegler, A., Burmeister, H.R., Jensen, A.H., 1979, Acceptance by swine and rats of corn amended with trichothecenes. Appl Environ Microbiol 38, 344-346.

Vesonder, R.F., Ciegler, A., Jensen, A.H., 1973, Isolation of the emetic principle from Fusarium-infected corn. Appl Microbiol 26, 1008-1010.

Vidal, D., Mavet, S., 1989, In vitro and in vivo toxicity of T-2 toxin, a Fusarium mycotoxin, to mouse peritoneal macrophages. Infect Immun 57, 2260-2264.

Vieira, P.L., Christensen, J.R., Minaee, S., O'Neill, E.J., Barrat, F.J., Boonstra, A., Barthlott, T., Stockinger, B., Wraith, D.C., O'Garra, A., 2004, IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. J Immunol 172, 5986-5993.

Vignali, D.A., Collison, L.W., Workman, C.J., 2008, How regulatory T cells work. Nat Rev Immunol 8, 523-532.

Volpe, E., Servant, N., Zollinger, R., Bogiatzi, S.I., Hupe, P., Barillot, E., Soumelis, V., 2008, A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. Nat Immunol 9, 650-657.

W

Wache, Y.J., Hbabi-Haddioui, L., Guzylack-Piriou, L., Belkhelfa, H., Roques, C., Oswald, I.P., 2009, The mycotoxin deoxynivalenol inhibits the cell surface expression of activation markers in human macrophages. Toxicology 262, 239-244.

Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breittmayer, J.P., Cottrez, F., Groux, H., 2003, Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. Immunity 18, 605-617.

Wan, Y.Y., Flavell, R.A., 2007, 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. Immunol Rev 220, 199-213.

Wannemacher, R., Wiener, S., 1991, Trichothecens mycotoxins, In: Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. pp. 655-676.

Watanabe, N., Wang, Y.H., Lee, H.K., Ito, T., Wang, Y.H., Cao, W., Liu, Y.J., 2005, Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. Nature 436, 1181-1185.

Watarai, H., Sekine-Kondo, E., Shigeura, T., Motomura, Y., Yasuda, T., Satoh, R., Yoshida, H., Kubo, M., Kawamoto, H., Koseki, H., Taniguchi, M., 2012, Development and function of invariant natural killer T cells producing T(h)2- and T(h)17-cytokines. PLoS Biol 10, e1001255.

Weaver, C.T., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Harrington, L.E., 2007, IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. Annu Rev Immunol 25, 821-852.

Weaver, G.A., Kurtz, H.J., Bates, F.Y., Chi, M.S., Mirocha, C.J., Behrens, J.C., Robison, T.S., 1978, Acute and chronic toxicity of T-2 mycotoxin in swine. Vet Rec 103, 531-535.

Wegst, W., Lingens, F., 1983, Bacterial-Degradation of Ochratoxin-A. Fems Microbiology Letters 17, 341-344.

Wei, L., Laurence, A., Elias, K.M., O'Shea, J.J., 2007, IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. J Biol Chem 282, 34605-34610.

Wilson, N.J., Boniface, K., Chan, J.R., McKenzie, B.S., Blumenschein, W.M., Mattson, J.D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., Lecron, J.C., Kastelein, R.A., Cua, D.J., McClanahan, T.K., Bowman, E.P., de Waal Malefyt, R., 2007, Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. Nat Immunol 8, 950-957.

Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K., Sabat, R., 2004, IL-22 increases the innate immunity of tissues. Immunity 21, 241-254.

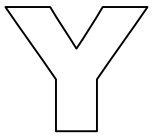
Workman, C.J., Szymczak-Workman, A.L., Collison, L.W., Pillai, M.R., Vignali, D.A., 2009, The development and function of regulatory T cells. Cell Mol Life Sci 66, 2603-2622.

Wu, F., 2004, Mycotoxin risk assessment for the purpose of setting international regulatory standards. Environ Sci Technol 38, 4049-4055.

Wu, Q., Dohnal, V., Huang, L., Kuca, K., Yuan, Z., 2010, Metabolic pathways of trichothecenes. Drug Metab Rev 42, 250-267.



Xiao, S., Jin, H., Korn, T., Liu, S.M., Oukka, M., Lim, B., Kuchroo, V.K., 2008, Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. J Immunol 181, 2277-2284.



Yagen, B., Bialer, M., 1993, Metabolism and pharmacokinetics of T-2 toxin and related trichothecenes. Drug Metab Rev 25, 281-323.

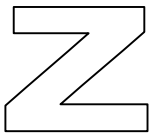
Yang, X.O., Nurieva, R., Martinez, G.J., Kang, H.S., Chung, Y., Pappu, B.P., Shah, B., Chang, S.H., Schluns, K.S., Watowich, S.S., Feng, X.H., Jetten, A.M., Dong, C., 2008, Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. Immunity 29, 44-56.

Yang, X.O., Panopoulos, A.D., Nurieva, R., Chang, S.H., Wang, D., Watowich, S.S., Dong, C., 2007, STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. J Biol Chem 282, 9358-9363.

Yao, Z., Painter, S.L., Fanslow, W.C., Ulrich, D., Macduff, B.M., Spriggs, M.K., Armitage, R.J., 1995, Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. J Immunol 155, 5483-5486.

Yiannikouris, A., Andre, G., Poughon, L., Francois, J., Dussap, C.G., Jeminet, G., Bertin, G., Jouany, J.P., 2006, Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with beta-D-glucans. Biomacromolecules 7, 1147-1155.

Ying, S., O'Connor, B., Ratoff, J., Meng, Q., Mallett, K., Cousins, D., Robinson, D., Zhang, G., Zhao, J., Lee, T.H., Corrigan, C., 2005, Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. J Immunol 174, 8183-8190.



Zenewicz, L.A., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Karow, M., Flavell, R.A., 2007, Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. Immunity 27, 647-659.

Zhai, Y., Sperkova, Z., Napoli, J.L., 2001, Cellular expression of retinal dehydrogenase types 1 and 2: effects of vitamin A status on testis mRNA. J Cell Physiol 186, 220-232.

Zhang, N., Pan, H.F., Ye, D.Q., 2011, Th22 in inflammatory and autoimmune disease: prospects for therapeutic intervention. Mol Cell Biochem 353, 41-46.

Zhou, H.R., Islam, Z., Pestka, J.J., 2005, Induction of competing apoptotic and survival signaling pathways in the macrophage by the ribotoxic trichothecene deoxynivalenol. Toxicol Sci 87, 113-122.

Zhou, L., Chong, M.M., Littman, D.R., 2009, Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. Immunity 30, 646-655.

Zhou, L., Ivanov, II, Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J., Littman, D.R., 2007, IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. Nat Immunol 8, 967-974.

Ziegler, S.F., Artis, D., 2010, Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. Nat Immunol 11, 289-293.

Zielinska-Jankiewicz, K., Kozajda, A., Piotrowska, M., Szadkowska-Stanczyk, I., 2008, Microbiological contamination with moulds in work environment in libraries and archive storage facilities. Ann Agric Environ Med 15, 71-78.

Ziprin, R.L., McMurray, D.N., 1988, Differential effect of T-2 toxin on murine host resistance to three facultative intracellular bacterial pathogens: Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, and Mycobacterium bovis. Am J Vet Res 49, 1188-1192.