UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

Oniris
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE, AGROALIMENTAIRE ET DE L'ALIMENTATION
SANTÉ ET ALIMENTATION AU CŒUR DE LA VIE

Thèse de Doctorat

Elodie BACOU

Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur d'Oniris - École Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : *Physiologie, physiopathologie et biologie systémique médicale*
Spécialité : *Immunologie*
Unité de recherche : *Immuno-Endocrinologie Cellulaire et Moléculaire (IECM)*
EA4644 Université de Nantes/Oniris USC 1383 INRA

Soutenue le *09 février 2017*

De l'importance des médiateurs du stress dans le contrôle de l'immunité

JURY

Rapporteurs :	**Armelle PRUNIER**, Directeur de recherche, INRA **Nicolas BERTHO**, Chargé de recherche, INRA
Examinateurs :	**Luc CHABANNE,** Professeur, VetAgro Sup **Jean-Marie BACH**, Professeur, Oniris
Directeur de Thèse :	**Blandine LIEUBEAU**, Chargé de recherche, INRA
Co-directeur de Thèse :	**Julie HERVE**, Maître de conférences, Oniris

Remerciements

Au terme de ces 3 années de thèse, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury.

Je remercie Monsieur Jean-Marie Bach de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour effectuer ma thèse et d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse.

Je remercie également Madame Armelle Prunier et Monsieur Nicolas Bertho pour avoir consacré de leur temps pour évaluer mon document en tant que rapporteurs.

J'associe à ces remerciements Monsieur Luc Chabanne pour avoir accepté d'être examinateur de cette thèse.

Je souhaite exprimer ma plus grande gratitude à Madame Blandine Lieubeau et Madame Julie Hervé pour m'avoir encadrée durant cette thèse. Merci pour votre gentillesse, votre patience, votre aide, votre soutien sans faille et vos conseils durant ces 3 années. J'ai énormément appris à vos côtés. Vous pouvez être assurées de mon profond respect.

Je remercie vivement Monsieur Pierre Mormède pour son expertise sur le stress animal, de nous avoir donné l'opportunité d'utiliser ses cochons pour nos expériences et d'avoir accepté de participer à mon comité de suivi de thèse. Je remercie également Madame Catherine Belloc pour avoir aussi accepter de faire partie de mon comité de suivi de thèse.

Je remercie également Monsieur Yvon Billon et les animaliers du Magneraud pour des prélèvements sanguins de qualité chez les porcelets.

Je remercie aussi Monsieur Olivier Gauthier pour les prélèvements d'organes sur les porcs nouveaux-nés.

Je remercie Madame Monique Zagorec pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire SECALIM et m'avoir fait redécouvrir la bactériologie.

Je remercie également tous les membres de l'équipe « adrenateam », Grégoire, Marie et plus particulièrement Karine. Merci pour vos remarques tout au long de cette thèse et vos aides précieuses. Sachez que c'était un réel plaisir de travailler à vos cotés. J'associe à ces remerciements tous les autres membres du laboratoire IECM, Steffi, Mathilde, Dominique, Laurence, Sylvie, Corentin et Anne-Sylvie. Merci pour votre gentillesse, votre sympathie, vos encouragements et votre bonne humeur.

Je tiens à remercier Lionel Martignat qui m'a donné l'opportunité de faire des vacations.

Je remercie également Anne, ma collègue de bureau. Ton arrivée au laboratoire a été un grand soulagement. Cela a été un plaisir de partager cette thèse avec toi, merci pour tes encouragements en cette fin de thèse. Bon courage pour la fin de ta thèse.

Je souhaite remercier aussi Anne-Sophie, merci de m'avoir intégrer à l'association ATD me permettant de connaître les doctorants d'Oniris. Je remercie aussi Lucie, Lydie, Géraldine, Judith et Amélie qui m'ont permis à certains moments de penser à autre chose et avec qui j'ai pu passer du temps à refaire le monde.

À titre plus personnel, je remercie spécialement Esteban pour ta patience et tes encouragements tout au long de ma thèse. Merci d'être là et de me soutenir dans mes projets.

Enfin, mes derniers remerciements et pas des moindres vont à mes parents. Aucun mot ne sera assez fort pour vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi ces dernières années. Vous avez toujours été là avec Céline pour me soutenir et m'encourager. Je n'en serais sûrement pas là aujourd'hui sans vous.

Table des matières

Remerciements 2
Table des matières 4
Communications et article 8
Liste des figures 10
Liste des tableaux 12
Liste des abréviations 14
Avant propos 16
Introduction générale 20

I- La physiologie de la réponse au stress 20
I-1- Le concept de stress 20
I-2- L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien 24
I-2-a- Activation de l'axe HPA par un agent stressant 24
I-2-b- Biosynthèse des glucocorticoïdes 26
I-2-c- Récepteurs aux glucocorticoïdes 27
I-3- L'axe sympatho-adréno-médullaire 29
I-3-a- Anatomie et activation par un agent stressant 29
I-3-b- Biosynthèse et dégradation des catécholamines 31
I-3-c- Récepteurs adrénergiques 32
I-4- La communication entre les axes HPA et SAM 35
I-5- Les différentes natures de stress 37
I-5-a- Stress aigu 37
I-5-b- Stress chronique 37
I-6- Les différents types de stress 38
I-8- Les facteurs influençant les réponses à un agent stressant 41
I-8-a- Effets du sexe 41
I-8-b- Effets de l'âge 42
I-8-c- Effets de la variabilité génétique 42

II- Les principaux mécanismes de l'immunité 46
II-1- Les barrières épithéliales 46
II-2- Les cellules de l'immunité 47
II-3- Les Toll-Like Receptors 49
II-4- La phagocytose 52
II-5- L'apprêtement et la présentation des antigènes 54
II-6- La synapse immunologique 57
II-7- La polarisation des LT $CD4^+$ 59

II-8- Les lymphocytes B 61

III- Le concept de la psychoneuroimmunologie 64
III-1- Mise en évidence du contrôle neuroendocrinien de l'immunité 65
III-2- Vascularisation et innervation des organes lymphoïdes 65
III-2-a- La moelle osseuse 67
III-2-b- Le thymus 67
III-2-c- La rate 68
III-2-d- Les ganglions lymphatiques 68
III-3- Expression des récepteurs aux hormones du stress par les cellules immunitaires 69
III-4- Influence des cytokines sur l'axe HPA 70

IV- Les différents effets d'un stress sur l'immunité 72
IV-1- Effets sur la concentration de cytokines plasmatiques et tissulaires 72
IV-2- Effets sur la formule leucocytaire 74
IV-3- Effets sur les fonctions des cellules de l'immunité innée 76
IV-3-a- Les neutrophiles 76
IV-3-b- Les macrophages 78
IV-3-c- Les cellules NK 78
IV-4- Effets sur les fonctions des cellules dendritiques 79
IV-5- Effets sur les fonctions lymphocytaires 81
IV-5-a- Les lymphocytes B 81
IV-5-b- Les lymphocytes T 82
IV-6- Quelques exemples des effets des agents stressants sur les maladies 83
IV-6-a- Les maladies auto-immunes 83
IV-6-b- Le cancer 85

V- De l'intérêt du modèle porcin en neuroimmunologie 88
V-1- Le porc comme modèle pour l'homme 88
V-2- Le stress chez le porc domestique 89
V-2-a- Les indicateurs des réponses neuroendocriniennes 90
V-2-b- Les facteurs influençant les réponses au stress chez le porc 91
V-3- Le système immunitaire du porc 93
V-3-a- Les barrières épithéliales 94
V-3-b- Les organes lymphoïdes 94
V-3-c- Les cellules immunitaires 95
V-3-d- Les molécules du système immunitaire 98
V-4- La neuroimmunologie chez le porc 100

Les objectifs de la thèse 104

PREMIERE ETUDE EXPERIMENTALE : Effets d'un stress social aigu sur l'immunité porcine 108
DEUXIEME ETUDE EXPERIMENTALE : Effets des catécholamines sur des macrophages porcins 124
I- Introduction 124
II- Matériel et méthodes 127
III- Résultats 131
III-1- Les BMM porcins expriment les marqueurs de macrophage 131
III-2- Les BMM porcins expriment les récepteurs adrénergiques 132
III-3- Les agonistes β2-adrénergiques modulent les sécrétions de cytokines induites par le LPS 133
III-4- Les agonistes β2-adrénergiques n'affectent pas les activités antimicrobiennes des BMM porcins 134
III-5- Effets des agonistes β2-adrénergiques sur l'expression des molécules de SLAII DR 136
III-6- Le formotérol diminue l'expression des gènes CXCL13, IDO1, IL7R et CCL20 induite par le LPS 137
IV- Discussion 145
Discussion générale 152
Bibliographie 161

Communications et article

Ce travail de thèse a donné lieu à des communications orales et un article.

Communications orales

Bacou E, Haurogné K, Allard M, Marchand J, Mignot G, Billon Y, Bach JM, Mormède P, Hervé J et Lieubeau B (2014). Analysis of mixing-induced stress consequences on immune traits in pigs. Journées scientiques de l'école doctorale Biologie Santé, Nantes.

Bacou E, Haurogné K, Mignot G, Marchand J, Allard M, Billon Y, Bach JM, Mormède P, Hervé J et Lieubeau B (2016). Social stress modulates piglet immune system. 10èmes journées du réseau français « Immunologie des animaux domestiques », Ploufragan.

Bacou E, Haurogné K, Mignot G, Allard M, De Beaurepaire L, Marchand J, Billon Y, Bach JM, Mormède P, Hervé J et Lieubeau B (2016). Acute social stress modulates immune traits in pigs high- and low-responders to ACTH stimulation. 5th Animal Health and Veterinary Medicine Congress, Valencia
Prix de la meilleure conférence dans la catégorie « Young Researcher Forum »

Article

Bacou E, Haurogné K, Mignot G, Allard M, De Beaurepaire L, Marchand J, Terenina E, Billon Y, Jacques J, Bach JM, Mormède P, Hervé J et Lieubeau B (2017). Acute social stress-induced immunomodulation in pigs high and low responders to ACTH. Physiology and Behavior 169 :1-8

Liste des figures

Figure 1- Les quatre formes de la surcharge allostatique 22
Figure 2- Modèle graphique du « reactive scope model » 23
Figure 3- Principaux tissus constituant l'axe HPA 25
Figure 4- Voies de biosynthèse de la corticostérone et du cortisol 26
Figure 5- Mécanismes d'activation des récepteurs aux glucocorticoïdes 28
Figure 6- Libération de noradrénaline et d'adrénaline par le système SAM. 30
Figure 7- Voies de biosynthèse et de catabolisme des catécholamines 31
Figure 8- Structure schématique des récepteurs à sept domaines transmembranaires 32
Figure 9- Transduction du signal par l'activation du récepteur ADRβ2 33
Figure 10- Communication entre le locus cœruleus et le noyau paraventriculaire 35
Figure 11- Localisation et fonctions clés des organes principaux du système limbique 39
Figure 12- Principaux acteurs du système immunitaire 48
Figure 13- Voies de signalisation des différents TLR 51
Figure 14- Mécanisme de destruction d'une bactérie par un phagocyte 53
Figure 15- Voies de présentation des antigènes par les molécules du CMH de classe I 55
Figure 16- Voie de présentation des antigènes par les molécules du CMH de classe II 56
Figure 17- Synapse immunologique entre une cellule présentatrice d'antigène et un LT 57
Figure 18- Les différentes polarisations du lymphocyte T $CD4^+$ naïf 60
Figure 19- Activation des lymphocytes B par la voie thymo-dépendante 62
Figure 20- Voies de communication entre les systèmes neuroendocrinien et immunitaire 64
Figure 21- Voies descendantes du contrôle de l'immunité par le système neuroendocrinien 66
Figure 22- Modèle de la redistribution leucocytaire induite par les hormones du stress 75
Figure 23- Marqueurs permettant d'identifier les différents types cellulaires du système immunitaire chez le porc 95
Figure 24- Etat des connaissances actuelles sur la polarisation des lymphocytes T $CD4^+$ chez le porc comparé à la souris et l'humain 97
Figure 25- Analyse de l'acidification du phagosome. 129
Figure 26- Morphologie et phénotype des BMM porcins 131
Figure 27- Expression des ARNm codant les récepteurs adrénergiques par les macrophages porcins 132
Figure 28- Effets de l'Ad et du formotérol sur les sécrétions de TNF-α et d'IL-8 induites par le LPS 133
Figure 29- Analyse de la phagocytose par les BMM porcins. 134
Figure 30- Cinétique d'acidification du phagosome des BMM porcins après phagocytose. 135
Figure 31- Cinétique de la production de ROS induite par le PMA par les BMM porcins. 136
Figure 32- Expression des molécules de SLA II DR par les BMM porcins. 137
Figure 33- Expression des transcrits *CXCL13, IDO1, IL7R* et *CCL20* par les BMM porcins en réponse au LPS. 138
Figure 34- Effet du formotérol sur les quantités de transcrits induits par le LPS par les BMM porcins. 139
Figure 35- Effets du formotérol sur l'expression des transcrits M(IL-4) par les BMM porcins 140
Figure 36- Effet du formotérol et de l'ICI 118,551 sur les quantités des transcrits induits par le LPS par les BMM porcins. 141
Figure 37- Effet du formotérol sur l'expression des transcrits induits par le LPS par les BMM porcins après 18h de traitement. 142

Liste des tableaux

Tableau 1- Les différents ligands des TLR humains..... 50
Tableau 2- Autres molécules de co-stimulation. 59
Tableau 3- Récapitulatif des résultats obtenus concernant les effets des catécholamines sur les fonctions des macrophages porcins en réponse au LPS. 143
Tableau 4- Séquences des amorces utilisées 144

Liste des abréviations

6-OHDA : 6-hydroxydopamine
ACTH : Hormone adrénocorticotrope
Ad : Adrénaline/Épinéphrine
ADR : Récepteurs adrénergiques
AF647 : Alexa Fluor® 647
ARNm : Acide ribonucléotide messager
ATP : Adénosine triphosphate
AVP : Arginine vasopressine
BCR : B cell receptor
BHE : Barrière hémato-encéphalique
BMM : Macrophages dérivés de cellules de moelle osseuse
CF : Cortex préfrontal
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
COMT : Catéchol-O-méthyl transférase
Con-A : Concanavaline-A
CPA : Cellules présentatrices d'antigènes
CR : Récepteurs au complément
CREB : cAMP response element-binding protein
CRH : Corticolibérine
DC : Cellules dendritiques
DNFB : Dinitrofluorobenzène
E.coli : *Escherichia coli*
FITC : Isothiocyanate de fluorescéine
GC : Glucocorticoïdes
HPA : Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien
icv : Intracérébroventriculaire
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
ip : Intrapéritonéale
IRF : Interferon-regulatory factor
iv : Intraveineuse
JNK : c-Jun N-terminal kinase
KO : Knock-out
LB : Lymphocytes B
LC : Locus cœruleus
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Lymphocytes T
MAO : Mono-amine-oxydase
M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor
MDM : Macrophages dérivés de monocytes
NA : Noradrénaline/Norépinéphrine
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NK : Natural killer
NO : Monoxyde d'azote
NVP : Noyau paraventriculaire
PAMP : Motifs moléculaires associés aux pathogènes

PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique
PCR : Réactions en chaîne par polymérase
PHA : Phytohémagglutinine
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PKA : Protéine kinase A
PKC : Protéine kinase C
PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate
POMC : pro-opiomélanocortine
PRRS : Syndrome dysgénésique et respiratoire porcin
RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G
RE : Réticulum endoplasmique
RG : Récepteurs aux glucocorticoïdes
RM : Récepteurs aux minéralocorticoïdes
ROS : Espèces réactives oxygénées
SAM : Axe sympatho-adréno-médullaire
SLA : Swine leucocyte antigen
TCR : T cell receptor
TH : Tyrosine hydroxylase
TLR : Toll like receptor
TNF-α : Tumor necrosis factor α
TSST : Trier social stress test

Avant propos

Dans le langage courant, le mot « stress » revêt une connotation négative. Pourtant, le stress n'est pas que négatif mais peut être positif. Les conséquences d'un stress diffèrent suivant sa durée, limitée ou chronique. Ainsi, un stress limité ou modéré n'est généralement pas délétère pour l'organisme qui y répond par la lutte ou la fuite. En revanche, une exposition trop longue ou répétée à un agent stressant pourrait favoriser le développement de certaines pathologies comme les maladies cardiovasculaires, les troubles anxieux et dépressifs ou le burn-out.

Le stress est un mécanisme avec des origines multiples (physiques, psychologiques ou sociales) produisant des réponses différentes suivant sa durée (aigu ou chronique) et l'individu (sexe, perception du stress, capacité d'adaptation et génétique). Tous ces paramètres rendent la compréhension du stress complexe et surtout difficile à définir de manière simple. Toutefois, la définition du stress proposée par McEwen est très souvent utilisée (McEwen, 2000): le stress serait « une menace réelle ou interprétée de l'intégrité physiologique (homéostasie) ou psychologique d'un individu qui aboutit à des réponses physiologiques ou comportementales ». Il est important de distinguer deux notions différentes : l'agent stressant qui est un perturbateur de l'organisme et le stress qui correspond à la réponse physiologique et/ou comportementale de l'organisme suite à l'exposition à un agent stressant. Récemment, un groupe de travail sur les questions conceptuelles autour de la notion de stress a souligné l'importance de considérer les aspects cognitifs et perceptifs d'un agent stressant en plus des seules réponses comportementales et physiologiques (Koolhaas et al., 2011).

Le stress est devenu un enjeu majeur de santé publique. Le stress peut moduler les réponses immunitaires et augmenter la susceptibilité aux maladies. La compréhension du fonctionnement et des conséquences du stress est nécessaire pour améliorer le bien-être et la santé des individus.

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

I- La physiologie de la réponse au stress

I-1- Le concept de stress

Claude Bernard a été le premier à décrire que l'organisme était capable de maintenir un équilibre constant – le « milieu intérieur » – malgré des conditions environnementales variables. Quelques années plus tard, Walter Cannon nomme cet équilibre l'homéostasie (Cannon, 1932).

Lorsqu'il se trouve face à des stimuli menaçant l'homéostasie (exposition au froid, douleur, hypoglycémie…), l'organisme déploie une réponse physiologique de type « fight or flight » (la lutte ou la fuite). Cette réponse implique l'activation de la glande surrénale et du système nerveux sympathique avec libération de catécholamines contribuant à la restauration de l'état d'équilibre (Cannon, 1939).

Hans Selye est à l'origine du concept de stress comme un « syndrome d'adaptation générale » défini comme « un ensemble de réponses non spécifiques de l'organisme face à un agent stressant » (Selye, 1950). Ces réponses évoluent en trois phases successives. La phase d'alarme qui se traduit par l'activation du système nerveux sympathique. Lorsque la situation stressante persiste, l'organisme entre en phase de résistance dite d'adaptation caractérisée par l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Enfin, la phase d'épuisement intervient lorsque l'organisme n'est plus capable de s'adapter à l'agent stressant. Depuis la première utilisation du terme « stress » par Hans Selye, la définition de ce concept a été largement débattue.

John Mason, dans les années 1970, a mis en évidence l'importance des facteurs émotionnels dans la réponse à un stimulus stressant suite à une expérience avec deux groupes différents de singes mis à jeun pendant 3 jours (Mason, 1971). Le premier groupe de singe est placé dans la même chambre que des singes ayant mangé normalement. Lors du repas, les singes à jeun regardent d'autres singes être nourris. Ces singes présentent un comportement de protestation et un taux élevé d'adrénaline, de noradrénaline et de 17α-hydroxycorticostérone. Dans un deuxième groupe de singes à jeun placés dans une chambre isolée, il détecte une concentration élevée d'adrénaline et de noradrénaline mais pas de 17α-

hydroxycorticostérone. En comparant les données obtenues dans les deux groupes de singes soumis à un même agent stressant (la mise à jeun), Mason démontre que l'ajout d'un agent stressant psychologique peut moduler la réponse physiologique au stress.

Puis, de nouveaux concepts ont émergé : l'allostasie et la surcharge allostatique (Figure 1). Le terme d'allostasie désigne le processus qui permet l'adaptation de l'organisme par des changements physiologiques et comportementaux pour maintenir un état d'équilibre (Sterling and Eyer, 1988). La surcharge allostatique réfère au « coût » infligé à l'organisme lorsqu'il est exposé à un stress chronique ou répété. L'organisme n'est alors plus capable de s'adapter (McEwen, 1998).

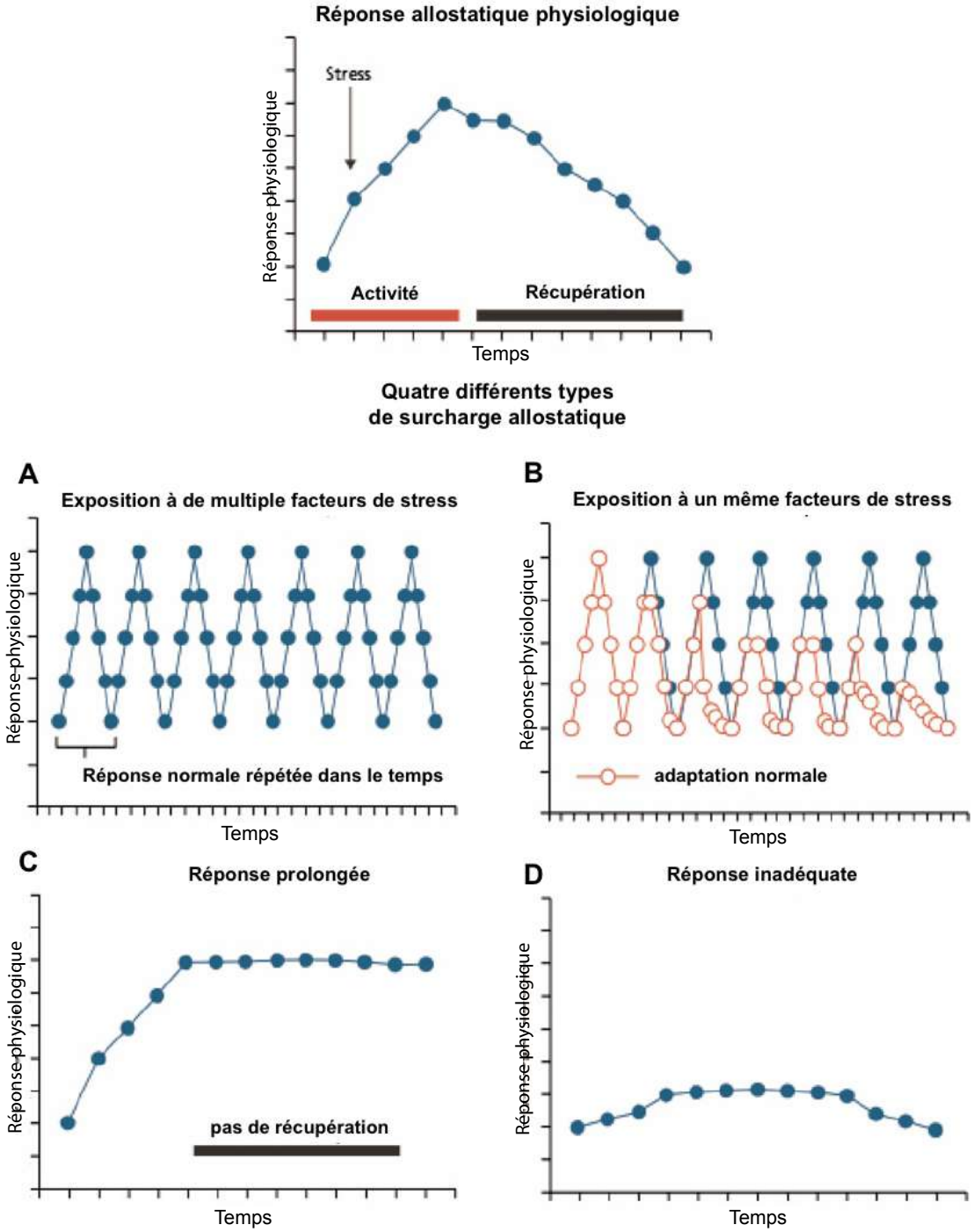


Figure 1- Les quatre formes de la surcharge allostatique. Le graphique supérieur représente la réponse allostatique physiologique à un agent stressant. Les 4 autres graphiques (A-D) illustrent les 4 types de surcharge allostatique. A- Lors d'une exposition à de multiples agents stressants différents, l'organisme est exposé autant de fois aux hormones du stress. B- Dans le cas d'une exposition répétée à un même agent stressant, en général, l'organisme s'habitue à ce facteur et on observe une atténuation de la réponse physiologique. C- Parfois, l'organisme échoue à revenir à un niveau basal de sécrétion d'hormones du stress à la fin de l'expostion au agent stressant. D- Dans le cas d'un épuisement, l'organisme n'est plus capable de répondre à un agent stressant et le niveau d'hormones du stress n'augmente pas (d'après McEwen, 2007).

Le concept d'allostasie est aujourd'hui contesté notamment par le fait que ce modèle ne prend pas en compte les aspects cognitifs et perceptifs d'un agent stressant propres à chaque individu. En effet, de nouveaux modèles plus complexes ont émergé. Le « reactive scope model » est un modèle graphique considéré comme un affinement du concept d'allostasie (Romero et al., 2009).

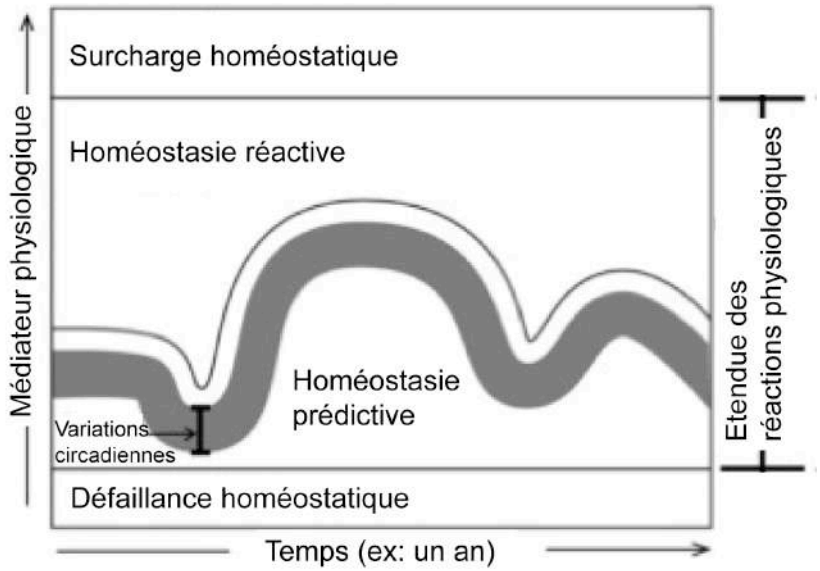


Figure 2- Modèle graphique du « reactive scope model » (d'après Romero et al., 2009)

Ce modèle graphique est divisé en 4 parties différentes. Dans ce modèle, la défaillance homéostatique correspond au fait que les médiateurs sont insuffisants pour maintenir des fonctions physiologiques normales. L'homéostasie prédictive représente la gamme de médiateurs impliqués dans les changements normaux circadiens et saisonniers entraînant des ajustements pour faire face à une situation environnementale prévisible. L'homéostasie réactive concerne la gamme de médiateurs nécessaire pour le rétablissement de l'homéostasie suite à une situation environnementale imprévisible et menaçante. Les homéostasies prédictive et réactive représentent l'étendue des réactions normales pour un individu. La surcharge homéostatique correspond à une surcharge en médiateurs qui perturbe le fonctionnement normal, l'individu rentre alors dans un état pathologique.

L'importance de ces aspects de prévisibilité et de contrôlabilité d'un agent stressant a été soulignée lors d'un groupe de travail sur la recherche sur le « stress » (Koolhaas et al., 2011). Ce groupe de travail a été jusqu'à proposer de réserver le terme « stress » « aux seules conditions où une demande environnementale dépasse la capacité régulatrice naturelle d'un organisme dans des conditions particulières incluant l'imprévisibilité et l'incontrôlabilité ». Si

l'on s'en tenait à cette définition, un « agent stressant » induisant des réponses physiologiques et comportementales normales permettant le retour à l'équilibre ne serait plus considéré comme un agent stressant… Toutefois, cette définition du « stress » nécessite d'identifier au préalable les agents stressants et de déterminer les capacités adaptatrices (réponses neuroendocriniennes et comportementales) individuelles.

Les agents stressants, généralement caractérisés par leurs nature, intensité, durée, fréquence, prévisibilité et contrôlabilité, activent deux voies principales : l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS ou HPA « Hypothalamic pituitary adrenocortical axis ») et l'axe sympatho-adréno-médullaire (SAM).

I-2- L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

I-2-a- Activation de l'axe HPA par un agent stressant

L'axe HPA est constitué de différents tissus situés dans l'hypothalamus, l'hypophyse antérieure et la glande surrénale (Figure 3).

En réponse à un agent stressant, le noyau paraventriculaire (NPV) de l'hypothalamus synthétise et secrète majoritairement de la corticolibérine (CRH) (Smith and Vale, 2006). L'arginine vasopressine (AVP) est aussi sécrétée par le NPV. L'AVP a pour effet de renforcer l'effet stimulateur de la CRH. La CRH est ensuite transportée dans l'antéhypophyse pour se fixer à son récepteur. Il existe deux types de récepteurs à la CRH (CRHR) : le CRHR1 exprimé dans le cerveau et l'hypophyse et le CRHR2 exprimé dans les tissus périphériques. L'action de la CRH est médiée par le CRHR1. La fixation de la CRH aux CRHR1 permet la synthèse de la pro-opiomélanocorticotropine (POMC), précurseur de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH). La POMC est ensuite clivée par des prohormones convertases, PC1 et PC2, et permet la libération d'ACTH et de mélanotropine. L'ACTH se fixe ensuite sur les récepteurs aux mélanocortines de type 2 (MC2-R) dans la corticosurrénale. L'activation du récepteur MC2-R permet la synthèse de glucocorticoïdes : cortisol chez l'homme et le porc et corticostérone chez les rongeurs.

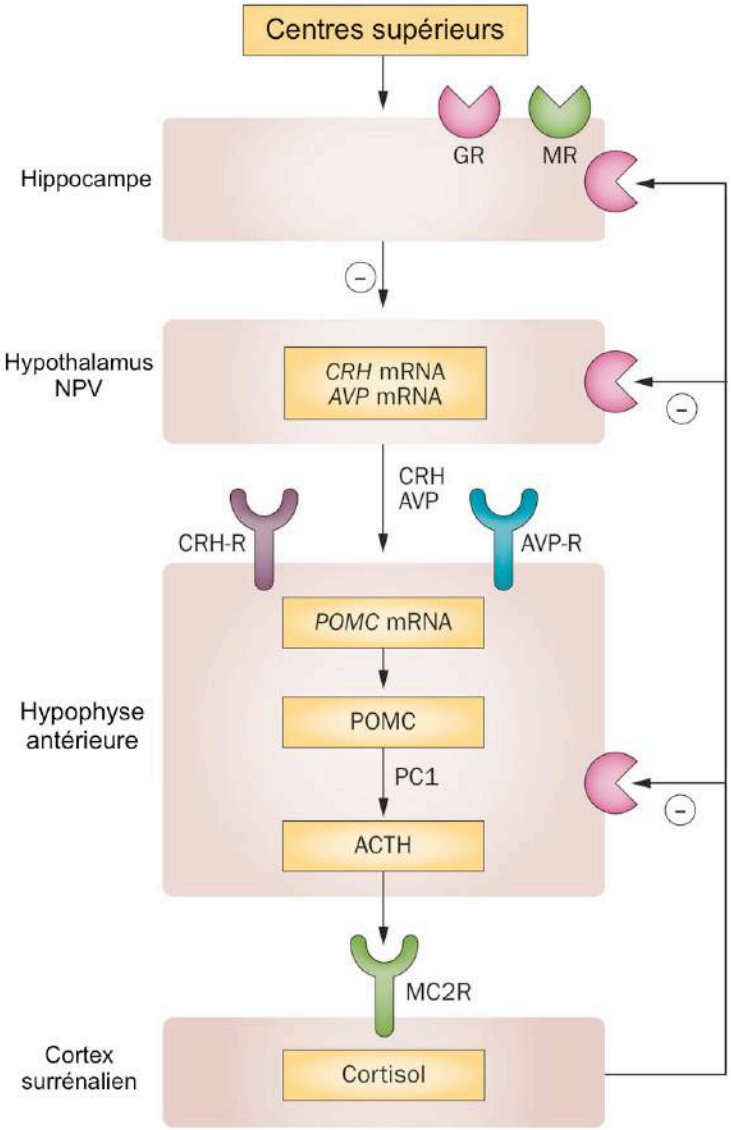


Figure 3- Principaux tissus constituant l'axe HPA (d'après Moisiadis and Matthews, 2014). GR, récepteur aux glucocorticoïdes ; MR, récepteur aux minéralocorticoïdes.

Des récepteurs aux glucocorticoïdes (RG) sont exprimés dans l'hippocampe, l'hypothalamus et l'hypophyse. À très forte concentration, les glucocorticoïdes (GC) exercent un rétrocontrôle négatif sur la production de CRH et d'ACTH par l'intermédiaire des récepteurs aux glucocorticoïdes.

Dans le cas d'un agent stressant psychologique, le système limbique est activé et module les réponses endocriniennes de l'axe HPA. Cette activation du système limbique est développée dans la partie I-6.

I-2-b- Biosynthèse des glucocorticoïdes

La biosynthèse des GC a lieu dans les cellules de la zone fasciculée du cortex surrénalien. Si le cortisol et la corticostérone ont la même origine, le cholestérol, ils possèdent des voies de biosynthèse différentes (Figure 4).

Une fois le cholestérol dans le cytoplasme, il est transporté dans la mitochondrie. En présence d'ACTH, l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (CYP11A1) catalyse la transformation du cholestérol en prégnénolone. La prégnénolone sort alors de la mitochondrie pour aller dans le réticulum endoplasmique où une série d'hydroxylations et de déshydrogénations, réalisée par des enzymes de la famille du cytochrome P450, conduit à la formation du cortisol, hormone biologiquement active chez l'homme et le porc.

Chez les rongeurs, la 17α-hydroxylase (CYP17) est absente, expliquant que la corticostérone soit le produit majeur de cette voie de biosynthèse.

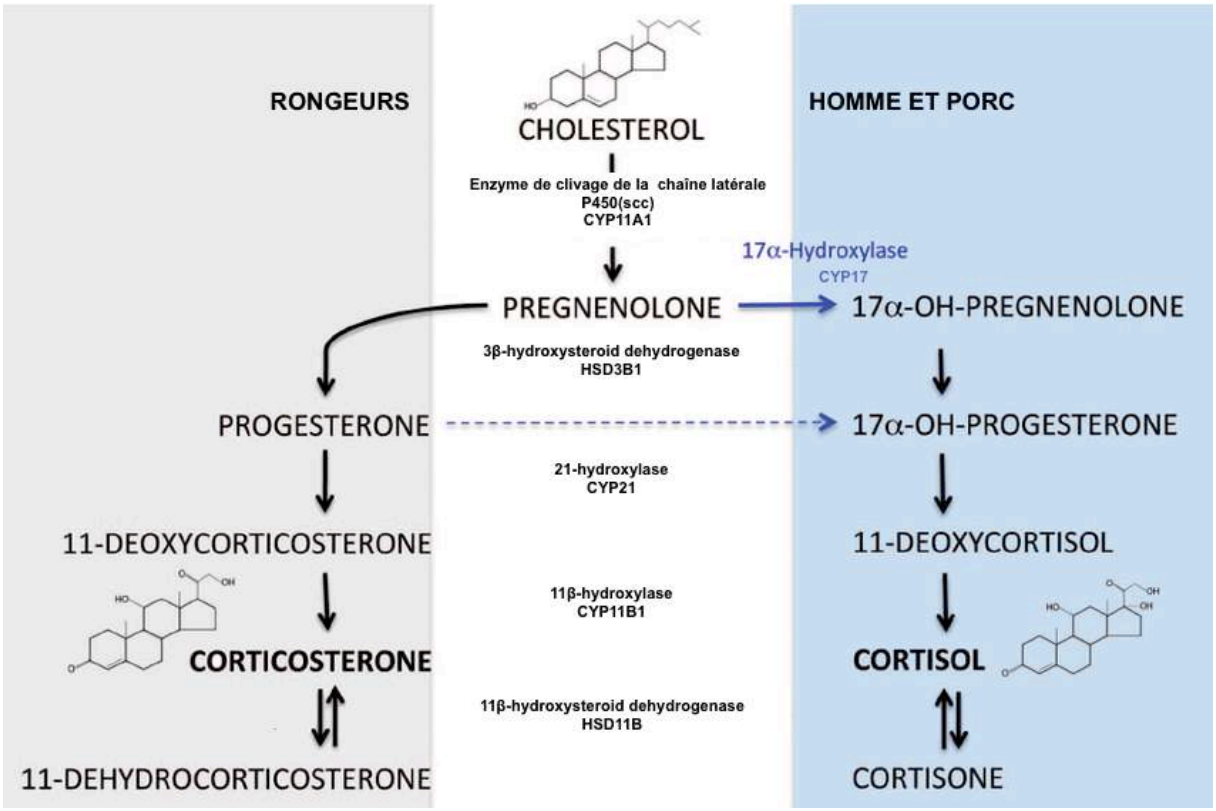


Figure 4- Voies de biosynthèse de la corticostérone et du cortisol (d'après Kostadinova et al., 2014)

Une fois sécrétés, les GC de nature lipophile circulent jusqu'aux cellules cibles dont ils traversent facilement la membrane plasmique.

I-2-c- Récepteurs aux glucocorticoïdes

Une fois dans les cellules, les GC agissent en liant deux types de récepteurs structurellement semblables : les récepteurs aux glucocorticoïdes (RG) et les récepteurs aux minéralocorticoïdes (RM). Ces deux types de récepteurs sont exprimés dans un grand nombre de tissus, et le plus souvent, par les mêmes cellules, où ils interagissent au niveau moléculaire et fonctionnel pour moduler différentes fonctions (Gomez-Sanchez and Gomez-Sanchez, 2014).

Le RM a la même affinité pour les GC que pour l'aldostérone. Etant donné que le nombre de cellules de la zone fasciculée de la corticosurrénale excède largement le nombre de cellules de la zone glomérulée (qui ne contient que quelques cellules sous la capsule surrénalienne), la quantité de GC circulante est 100 à 1000 fois supérieure à la quantité d'aldostérone circulante. Il est donc admis, qu'à l'état basal, les GC activent les RM, tandis qu'ils activent les RG en cas de stress.

Dans ces conditions, la régulation en amont du récepteur des stéroïdes est un mécanisme essentiel à la régulation de l'activation des récepteurs et de la spécificité des ligands. Ainsi, les cellules cibles de l'aldostérone sont protégées de l'action des GC par la présence à proximité du RM d'une enzyme, l'hydroxystéroïde déshydrogénase de type II (11-βHSD2), qui inactive les GC.

Les RG appartiennent à la famille des récepteurs aux stéroïdes. Ces récepteurs ont la structure moléculaire suivante : (1) un domaine N-terminal qui contient le principal domaine de transactivation, (2) un domaine de liaison à l'ADN en doigt de zinc et (3) un domaine C-terminal qui correspond au domaine de liaison du ligand (Tsai and O'Malley, 1994). La structure des RG est très conservée entre les espèces. Chez l'homme, deux principales isoformes des RG ont été décrites les RGα et les RGβ. L'isoforme RGα, d'un poids moléculaire de 90 kDa, est composée de 778 acides aminés est le plus présente dans les tissus (Nicolaides et al., 2010).

Sous forme inactive, les RG situés dans le cytoplasme sont associés à des protéines chaperonnes : les protéines de choc thermique (« heat shock protein » telle que HSP90) et les immunophilines (par exemple : FKBP51) (Pratt and Toft, 1997). Lorsque les GC se lient aux RG, les hétéro-complexes (RG-HSP-Immunophiline) changent de conformation ce qui

conduit à la dissociation des protéines chaperonnes. Les complexes RG-GC transloquent alors dans le noyau cellulaire.

Une fois dans le noyau, les complexes RG-GC se trouvent sous forme d'homodimères, le modèle le plus simple et classique, ou sous forme de monomères (Stahn et al., 2007). Les complexes RG-GC présents sous forme d'homodimères se fixent sur une région spécifique, appelée « Glucocorticoid Response Element » (GRE), du promoteur d'un gène cible. Suite à leurs fixations sur les séquences GRE ou nGRE, la transcription du gène cible peut être respectivement induite ou réprimée. Par exemple, les gènes codant la POMC et la CRH possèdent des séquences nGRE présentes dans leur promoteur (Dostert and Heinzel, 2004).

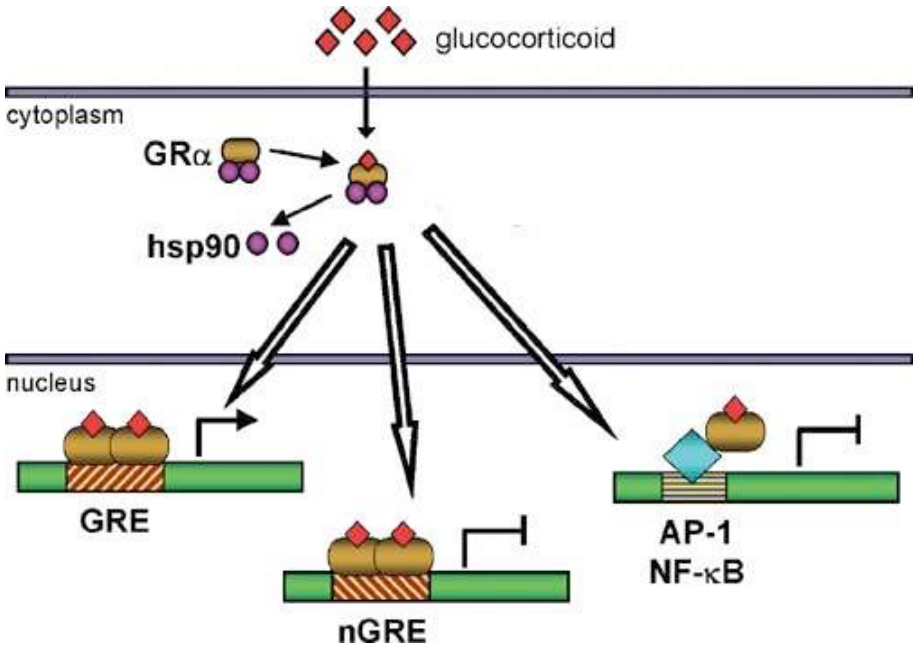


Figure 5- Mécanismes d'activation des récepteurs aux glucocorticoïdes (d'après Pujols et al., 2004). GR, récepteur aux glucocorticoïdes.

Les complexes RG-GC présents sous forme de monomères interagissent également avec des facteurs de transcription tels que AP-1 (« Activator Protein-1 ») et NF-κB (« Nuclear Factor-kappa B »).

La famille des facteurs de transcription AP-1 se compose principalement de 7 protéines (Shaulian and Karin, 2002). Parmi ces protéines, il y a 3 protéines Jun : Jun B, cJun et Jun D et 4 protéines Fos : cFos, Fos B, Fra-1 et Fra-2. Les facteurs de transcription AP-1 sont présents dans le cytoplasme sous forme d'homodimères (Jun/Jun ou Fos/Fos) ou d'hétérodimères (Jun/Fos), la forme cJun/cFos étant la plus représentée. Le complexe RG-GC dans le noyau se fixe sur la protéine Jun du facteur de transcription AP-1 empêchant la

transcription des gènes induite par AP-1 (Herrlich, 2001). L'activation des facteurs de transcription AP-1 permet la transcription de différents gènes impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire et l'apoptose.

La famille des facteurs de transcription NF-κB est composés de 5 protéines : p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/50 (NF-κB1) et p100/52 (NF-κB2) (Oeckinghaus and Ghosh, 2009). Ces protéines forment des complexes actifs sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères permettant d'induire des effets différents sur la transcription. La forme hétérodimérique p65/p50 est la plus représentée dans le cytoplasme. Dans les cellules à l'état basal, les dimères NF-κB cytoplasmiques sont maintenus sous forme inactive par leurs interactions avec la protéine IκB. En réponse à une stimulation, la protéine IκB est phosphorylée par la kinase IκB et se détache du dimère NF-κB permettant la translocation au noyau et la transcription de gènes cibles. L'activation des RG par les GC agit à deux niveaux : (i) le complexe RG-GC interagit avec la sous-unité p65 du facteur de transcription NF-κB empêchant la transcription des gènes induite par NF-κB et (ii) le complexe RG-GC augmente la transcription du gène codant IκB (Almawi and Melemedjian, 2002).

I-3- L'axe sympatho-adréno-médullaire

I-3-a- Anatomie et activation par un agent stressant

Les tissus principaux de l'axe sympatho-adréno-médullaire (SAM) sont le locus cœruleus (LC) situé dans le tronc cérébral, le système nerveux sympathique et la médullosurrénale (Figure 6).

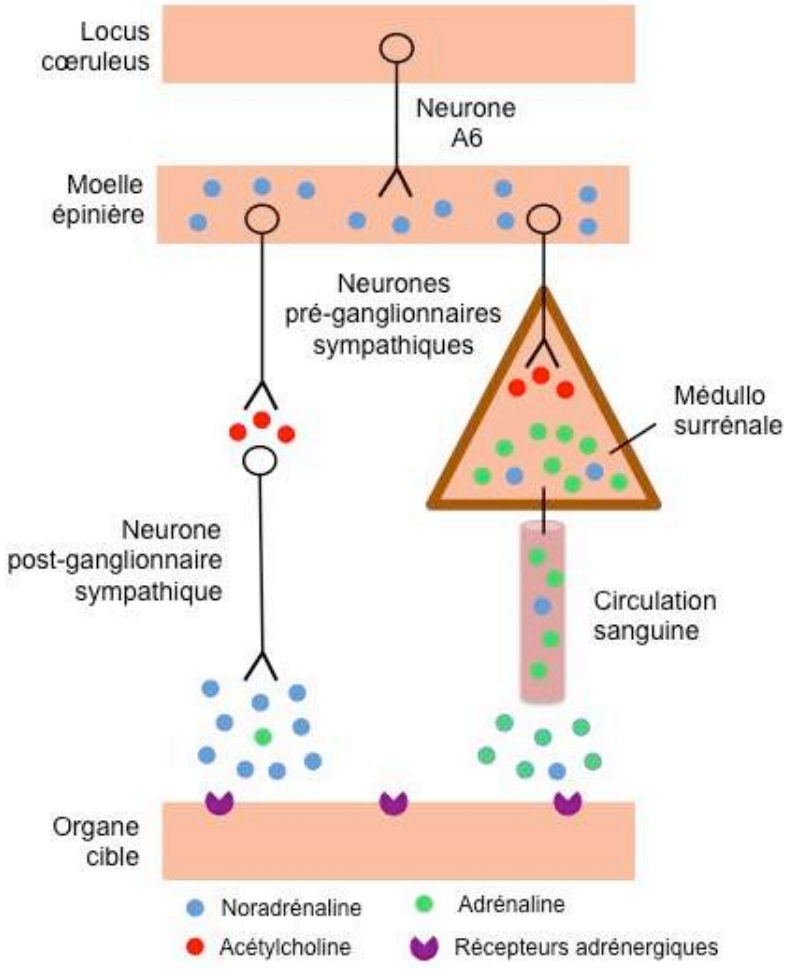


Figure 6- Libération de noradrénaline et d'adrénaline par le système SAM.

Dans le cerveau, il existe 7 différents groupes cellulaires composés de neurones noradrénergiques nommés de A1 à 7 et 3 groupes cellulaires différents composés de neurones adrénergiques nommés de C1 à 3. Le groupe A6 correspond au groupe cellulaire présent dans le locus cœruleus (LC). Les agents stressants stimulent les neurones noradrénergiques situés dans le LC. Les projections des neurones noradrénergiques du LC activent les neurones pré-ganglionnaires dont les corps cellulaires sont situés dans la moelle épinière. L'acétylcholine sécrétée par les neurones pré-ganglionnaires stimule les neurones post-ganglionnaires permettant *in fine* la libération de catécholamines, noradrénaline (NA, aussi appelée norépinéphrine) principalement et adrénaline (Ad, aussi appelée épinéphrine). Les neurones pré-ganglionnaires stimulent aussi les cellules endocriniennes chromaffines de la médullosurrénale permettant la libération de catécholamines, majoritairement l'Ad, dans la circulation sanguine.

I-3-b- Biosynthèse et dégradation des catécholamines

Contrairement aux GC, les voies de synthèse des catécholamines sont les mêmes pour toutes les espèces (Figure 7).

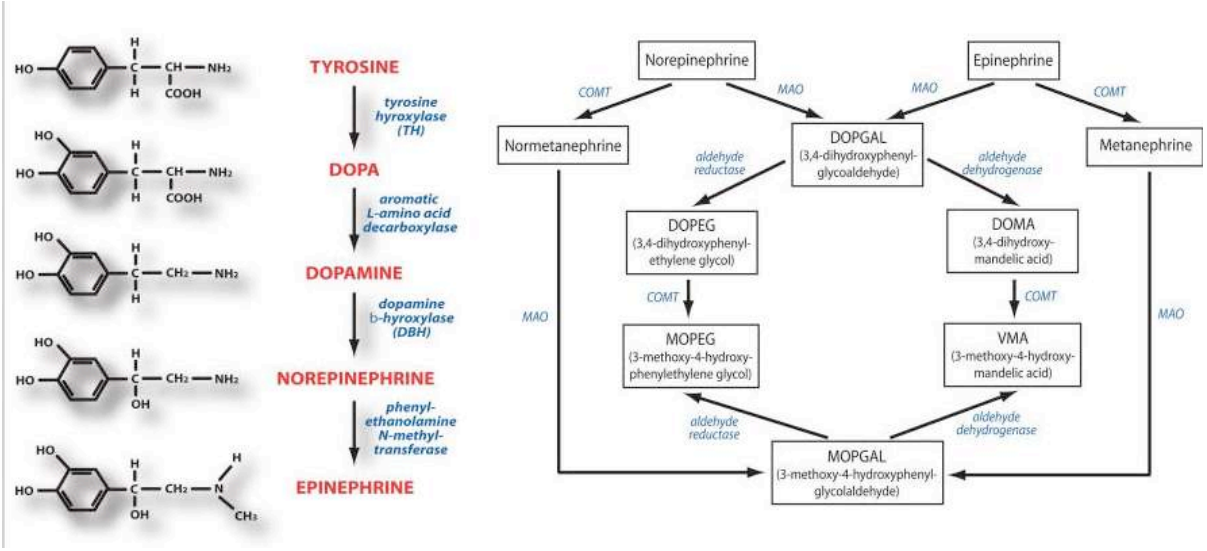


Figure 7- Voies de biosynthèse et de catabolisme des catécholamines (Flierl et al., 2008).

Les catécholamines sont synthétisées dans les neurones et les cellules chromaffines à partir de la tyrosine (Kvetnansky et al., 2009). La tyrosine est soit directement fournie par l'alimentation ou obtenue après transformation par la phénylalanine hydroxylase de la phénylalanine provenant de l'alimentation. La transformation de la tyrosine en dopamine par la tyrosine hydroxylase (TH) se fait dans le cytosol. La TH est l'enzyme limitante de la biosynthèse des catécholamines endogènes (NA, Ad et dopamine) et se trouve principalement dans les neurones catécholaminergiques et les cellules chromaffines. La transformation de la dopamine en NA se fait dans les vésicules d'exocytose. Les cellules chromaffines possèdent l'enzyme N-méthyl-transférase permettant la transformation de la NA en Ad.

La demi-vie des catécholamines est très courte. La NA libérée par les neurones est en grande partie recaptée par les terminaisons nerveuses (recapture intraneuronale) mais aussi pas les cellules gliales (capture extraneuronale) par le transporteur de la NA (NET). La présence à la membrane de NET est dépendante de l'entrée de Na^+ par l'intermédiaire des pompes Na^+/K^+ ATPase. Le Na^+ se fixe sur le NET augmentant son affinité pour la NA (Streby et al., 2015). Les catécholamines sont ensuite inactivées par deux enzymes : la catéchol-O-méthyl transférase (COMT) et la mono-amine-oxydase (MAO). La fraction de

NA non recaptée ou les catécholamines sécrétées par les cellules chromaffines circulent dans le sang pour atteindre les cellules cibles exprimant des récepteurs adrénergiques.

I-3-c- Récepteurs adrénergiques

Les récepteurs adrénergiques font partie de la grande famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires principalement couplés aux protéines G (RCPG). Ces récepteurs sont composés de domaines transmembranaires (TM 1 à 7) avec une structure en hélice α qui sont reliés par 3 boucles extracellulaires (EL1-3) et 3 boucles intracellulaires (ICL1-3) (Cherezov et al., 2007). Ils possèdent un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal intracytoplasmique (Figure 8).

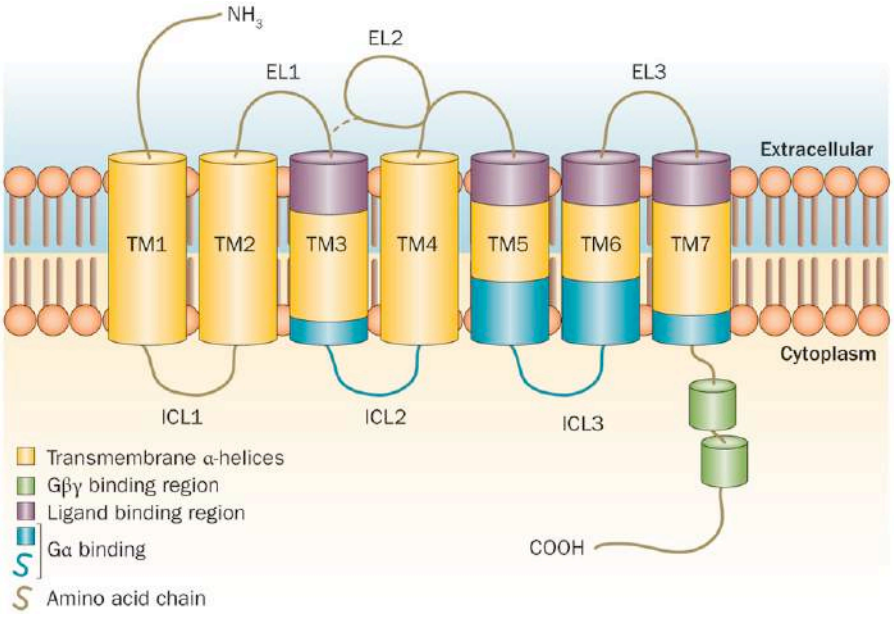


Figure 8- Structure schématique des récepteurs à sept domaines transmembranaires (Neumann et al., 2014).

Les récepteurs adrénergiques se répartissent en deux classes principales : les récepteurs α adrénergiques, α1 (ADRα1) et α2 (ADRα2), et les récepteurs β adrénergiques, β1 (ADRβ1), β2 (ADRβ2) et β3 (ADRβ3). Les catécholamines possèdent des affinités différentes pour les récepteurs adrénergiques. L'Ad possède une plus forte affinité pour les récepteurs ADRβ et la NA une plus forte affinité pour les récepteurs ADRα (Molinoff, 1984).

Le récepteur ADRβ2 est, à l'heure actuelle, le plus étudié, le plus connu et une cible utilisée actuellement en clinique pour traiter l'asthme (Rasmussen et al., 2007). Pour cette raison, je vais focaliser mon propos sur le récepteur ADRβ2 (Figure 9).

Chez l'homme, le récepteur ADRβ2 est une protéine de 413 acides aminés de poids moléculaire d'environ 46kDa et est le deuxième RCPG dont la structure a été cristallisée après la rhodopsine. Les résidus importants dans la liaison de l'agoniste au site actif sont : l'aspartate (Asp^{113}) du TM3, les sérines (Ser^{204} et Ser^{207}) du TM5 et les phénylalanines (Phe^{259} et Phe^{290}) du TM6.

La protéine G est localisée dans le cytoplasme en interaction avec les boucles ICL2 et ICL3 du récepteur (Kobilka, 2011). Les protéines G possèdent 3 sous-unités : Gα, Gβ et Gγ. Lorsqu'un agoniste se fixe sur un récepteur couplé aux protéines G, la sous-unité Gα se lie au GTP (guanosine triphosphate) et se dissocie des sous-unités Gβγ.

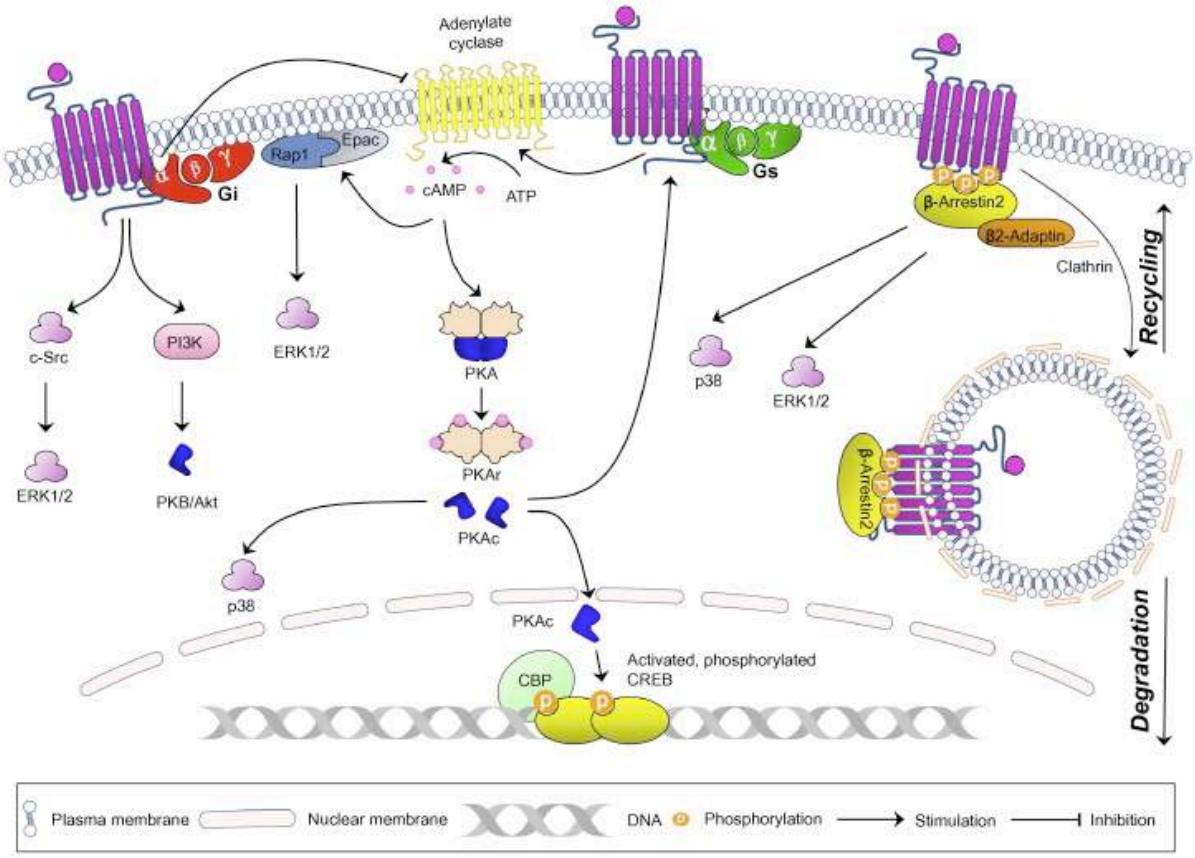


Figure 9- Transduction du signal par l'activation du récepteur ADRβ2 (Kolmus et al., 2015)

Les récepteurs ADRβ2 activés peuvent se coupler au complexe GTP-Gαs (Figure 8). Ce complexe entraîne l'activation de l'adénylate cyclase. Cet enzyme transforme l'ATP en AMPc (AMP cyclique). L'AMPc fonctionne comme un second messager intracellulaire.

L'augmentation d'AMPC active la PKA (protéine kinase AMPc dépendante) formée de 4 sous-unités : 2 sous-unités catalytiques (PKAc) et 2 sous-unités régulatrices (PKAr). L'activation de la PKA entraîne une libération des PKAc qui transloquent dans le noyau et phosphorylent la protéine CREB (« cAMP-responsive element binding protein ») (Mayr and Montminy, 2001) ainsi que des kinases cytoplasmique telles que la MAP (« Mitogen-Activated proteins ») kinase p38 (Zheng et al., 2000).

La protéine p38 activée transloque dans le noyau cellulaire et phosphoryle les kinases MSK (« Mitogen and Stress activated protein kinase »). Les MSK activent plusieurs facteurs de transcription dont CREB et NF-κB (Cuadrado and Nebreda, 2010).

Le facteur de transcription CREB (« cAMP-responsive element binding protein ») fait partie de la famille des facteurs de transcription CREB/ATF-1. Ces facteurs de transcription sous forme d'homodimères se lient à des séquences spécifiques appelées CRE (« cAMP-responsive element ») situées sur le promoteur de gènes cibles. Les gènes ciblés par CREB sont les gènes codant des cytokines (IL-2, IL-6, IL-10 ou TNF-α) et des molécules impliquées dans la prolifération cellulaire (Cyclin D1, Bcl-2).

En plus d'activer la PKA, l'AMPc active aussi des facteurs d'échange pour les petites protéines G (Epac). Ces protéines Epac activent Rap-1 impliqué dans la voie de signalisation des ERK 1/2 (« extracellular-signal regulated kinase ») (Bos et al., 2001). Une fois activées, les protéines ERK1/2 transloquent dans le noyau et activent les facteurs de transcription Ets, Fos et Elk1 impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire.

Les récepteurs ADRβ2 peuvent aussi être couplés au complexe GTP-Gαi (Daaka et al., 1997). Ce complexe inhibe l'activation de l'adénylate cyclase. Le complexe GTP-Gαi par l'intermédiaire des sous-unités Gβγ active la protéine PI3K (« phosphatidylinositol-3-kinase ») ainsi que la protéine ERK1/2. L'activation de la PI3K entraîne la phosphorylation du PIP2 (« phosphatidylinositol-4,5-biphosphate ») le transformant en PIP3 (« phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate ») considéré comme un second messager. Le PIP3 phosphoryle la kinase Akt (appelée aussi protéine kinase B) qui joue un rôle majeur dans la survie cellulaire en inactivant par phosphorylation les protéines pro-apoptotiques telles que la caspase-9 et Bad et active les facteurs de transcription de la famille des forkhead (Fox) et NF-κB.

Le récepteur ADRβ2 activé par un ligand est capable de s'autoréguler (Ferguson et al., 1996). Très vite après son activation, l'ADRβ2 est phosphorylé par la PKA et/ou la GRK (G

protein-coupled receptor kinase). Le récepteur se dissocie alors de la protéine G : on parle de désensibilisation. Par ailleurs, la phosphorylation entraîne le recrutement d'une protéine, la β-arrestine, qui se lie au récepteur permettant ensuite son internalisation par endocytose clathrine-dépendante. Une fois dans l'endosome, le récepteur est déphosphorylé avant d'être soit recyclé à la membrane plasmique soit dégradé. En plus d'internaliser les récepteurs, les β-arrestines sont capables d'activer les protéines ERK 1/2 et p38 MAPK (Ma and Pei, 2007).

I-4- La communication entre les axes HPA et SAM

Le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, responsable de la sécrétion de CRH, est en étroite communication avec les neurones noradrénergiques du LC (Figure 10).

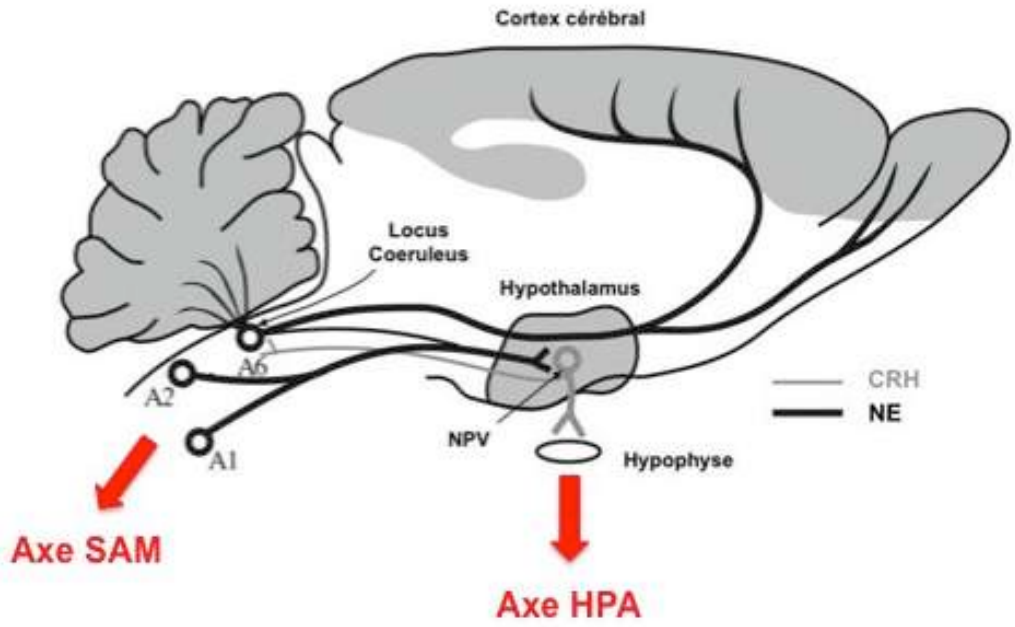


Figure 10- Communication entre le locus cœruleus et le noyau paraventriculaire (d'après Dunn and Swiergiel, 2008). NE, noradrénaline.

Dans les années 1980, le groupe de Rita Valentino a mis en évidence pour la première fois l'activation du LC par la CRH (Valentino et al., 1983). Une injection de CRH par voie *iv* ou directement dans le LC augmente l'activité électrophysiologique des neurones du LC chez le rat. Cette augmentation d'activité est due à la présence de fibres CRH^+ dans le LC, détectées

avec un anticorps anti-CRH chez le rat et l'homme (Valentino et al., 1992; Austin et al., 1995).

De manière réciproque, les fibres noradrénergiques innervent le NPV de l'hypothalamus. La présence de fibres nerveuses afférentes noradrénergiques dans le NPV de l'hypothalamus a été analysée par un double marquage d'immunohistochimie (Cunningham and Sawchenko, 1988). Le marquage avec une lectine de plante, utilisée comme un traceur antérograde, permet de marquer les fibres du NPV et le marquage avec un anticorps anti-β hydroxylase dopamine permet de marquer les neurones catécholaminergiques, la dopamine étant le précurseur de l'Ad et la NA. Cette étude a démontré que le NPV est fortement innervé par des fibres noradrénergiques dont les corps cellulaires proviennent des régions A1/A2 (neurones noradrénergiques du tractus solitaire) et A6 (neurones noradrénergiques du locus cœruleus) du tronc cérébral.

L'effet de la CRH sur les neurones du LC a été analysé chez des rats ayant subi des chocs électriques durant une seule session (30 min, aigu) ou durant 5 sessions (une session par jour, chronique) (Curtis et al., 1995). Un choc électrique aigu ne modifie pas significativement l'activité électrophysiologique des neurones du LC, alors qu'un choc électrique chronique l'augmente. L'injection d'un antagoniste de la CRH prévient l'effet d'un stress chronique sur l'activité des neurones du LC. Ainsi, la CRH est responsable de la stimulation des neurones du LC lors d'un stress chronique.

Une activité basale élevée des neurones du LC est une caractéristique des personnes dépressives. Une étude post-mortem a analysé la quantité de CRH présente dans le LC chez des personnes dépressives (Bissette et al., 2003). La concentration de CRH dans le LC chez les personnes dépressives est plus importante par rapport aux personnes sans syndromes dépressifs. La stimulation importante des neurones noradrénergiques du LC par la CRH pourrait contribuer à des syndromes dépressifs.

Maintenant que les réponses physiologiques principales du stress ont été détaillées, je vais décrire les différents paramètres permettant la caractérisation d'un stress dans la littérature. Les stress sont généralement définis selon leur nature (aigu ou chronique) et/ou leur type (physique ou psychologique).

I-5- Les différentes natures de stress

Dans la littérature, on distingue stress aigu (plusieurs minutes à quelques heures) et stress chronique (qui persiste pendant des jours à des mois) (McEwen, 2007).

I-5-a- Stress aigu

Une courte exposition à un agent stressant induit une réaction de lutte ou de fuite. Un agent stressant qui agit de manière rapide entraîne, dans les premières minutes, une augmentation du taux plasmatique de catécholamines, puis, dans un second temps, une augmentation du taux de GC (Dhabhar et al., 2012). Durant les premières minutes, l'Ad et la NA augmentent les fréquences cardiaque et respiratoire, la pression artérielle, la tension musculaire et induisent une vasoconstriction des vaisseaux périphériques. Tous ces phénomènes physiologiques facilitent le transport d'oxygène et de nutriments vers les cellules cibles. Contrairement aux catécholamines, les GC ont un effet décalé dans le temps mais durable. Les GC ont un effet hyperglycémiant permettant l'augmentation de la distribution de glucose aux cellules ainsi qu'un effet lipolytique permettant l'apport en énergie. Ils permettent aussi l'intensification de la vasoconstriction. Les taux de catécholamines et de GC reviennent au niveau basal au bout de quelques minutes ou heure après l'exposition à l'agent stressant. Le stress aigu est celui considéré par Selye comme vecteur de bon stress (« eustress ») puisqu'il n'entraîne pas de conséquences néfastes sur l'organisme.

I-5-b- Stress chronique

Une exposition prolongée à un agent stressant entraîne une activation continue des axes HPA et SAM. Elle est considérée comme source de mauvais stress (« distress ») selon la classification de Selye. La libération continue de catécholamines conduit à de l'hypertension et augmente le risque d'infarctus du myocarde (Mark, 1996). Un stress chronique entraîne aussi une résistance aux GC (Cohen et al., 2012). Cette résistance est caractérisée par une désensibilisation des RG. La disponibilité des RG étant plus faible, le rétrocontrôle sur l'axe HPA est défaillant malgré le taux élevé de GC. A l'issue de l'exposition chronique à un agent stressant, la résistance aux GC est réversible (Sapolsky et al., 1984). Une semaine après l'arrêt

d'injections quotidiennes de corticostérone pendant 3 semaines chez le rat, la concentration des RG au niveau de l'hippocampe et de l'amygdale revient à la normale.

Le stress chronique peut aussi résulter de l'exposition répétée à un même agent stressant. Dans ce cas précis, le système neuroendocrinien ne répond plus avec la même intensité. Une immobilisation quotidienne pendant 14 jours entraîne une diminution importante du taux d'ACTH plasmatique chez le rat au cours de l'expérience (Aguilera, 1994). Des résultats similaires sont observés chez l'homme suite à des sauts en parachute (Deinzer et al., 1997). Le pic du taux de cortisol diminue après le troisième saut par rapport au premier et deuxième saut. L'organisme s'habitue à l'agent stressant.

L'homme est souvent exposé à différents agents stressants plutôt qu'à un seul agent stressant de façon répétée. Pour mimer au mieux l'effet de plusieurs agents stressants chez l'homme, un modèle animal a été développé : le modèle de stress chronique léger imprévisible (« chronic mild stress ») (Willner et al., 1992). Le protocole de stress s'établit sur 4 semaines consécutives. Tous les jours, l'animal est exposé à un agent stressant différent. L'ordre et la fréquence des agents stressants varient d'une étude à l'autre. L'altération du cycle jour/nuit, l'isolement social, la privation de nourriture, l'inclinaison de la cage ou l'immersion dans l'eau sont les agents stressants les plus rencontrés.

Une exposition trop longue à un ou plusieurs agents stressants perçus comme sévères entraîne une phase d'épuisement. L'organisme n'est plus capable de s'adapter à l'agent stressant. Chez l'homme, cette phase d'épuisement est appelée le burn-out. Le syndrome du burn-out est caractérisé par une exacerbation des émotions, une dépersonnalisation, un manque de satisfaction, d'accomplissement personnel et une faible estime de soi (Weber and Jaekel-Reinhard, 2000). Très peu d'études ont analysé les conséquences d'un burn-out sur les réponses physiologiques. Néanmoins, si certaines n'ont pas démontré de différence dans le fonctionnement de l'axe HPA entre les personnes présentant un burn-out et les personnes en bonne santé (Langelaan et al., 2006; Mommersteeg et al., 2006), récemment le syndrome de burn-out a été associé à une réactivité moindre des axes SAM et HPA (de Vente et al., 2015).

I-6- Les différents types de stress

En plus de leur classification suivant leur durée, les auteurs distinguent stress physique (impliquant un mal physique ou un inconfort mesurable) et stress psychologique (quand une

situation est perçue ou considérée par l'individu comme menaçante, dangereuse ou indésirable). Si cette distinction semble aisée en théorie, en pratique, elle ne l'est pas toujours.

De nombreux modèles expérimentaux de stress de nature différente ont été développés particulièrement chez les rongeurs.

Parmi les modèles de stress physique classiquement utilisés et induisant une augmentation du taux de corticostérone, on retrouve l'hémorragie, l'injection unique de LPS ou d'IL-1β ou le choc électrique isolé (Dayas et al., 2001; Endo et al., 2001; Pérez-Nievas et al., 2010). La composante psychologique de ces modèles de stress est généralement négligeable excepté lorsqu'ils provoquent un inconfort ou une douleur.

Le stress psychologique engage le système limbique pour évaluer et intégrer l'information avant toute réponse. Les organes du système limbique (hippocampe, cortex préfrontal et amygdale) possèdent de nombreuses fibres nerveuses projetant vers l'hypothalamus et sont notamment impliqués dans la modulation de l'axe HPA (Herman et al., 2005) (Figure 11).

.

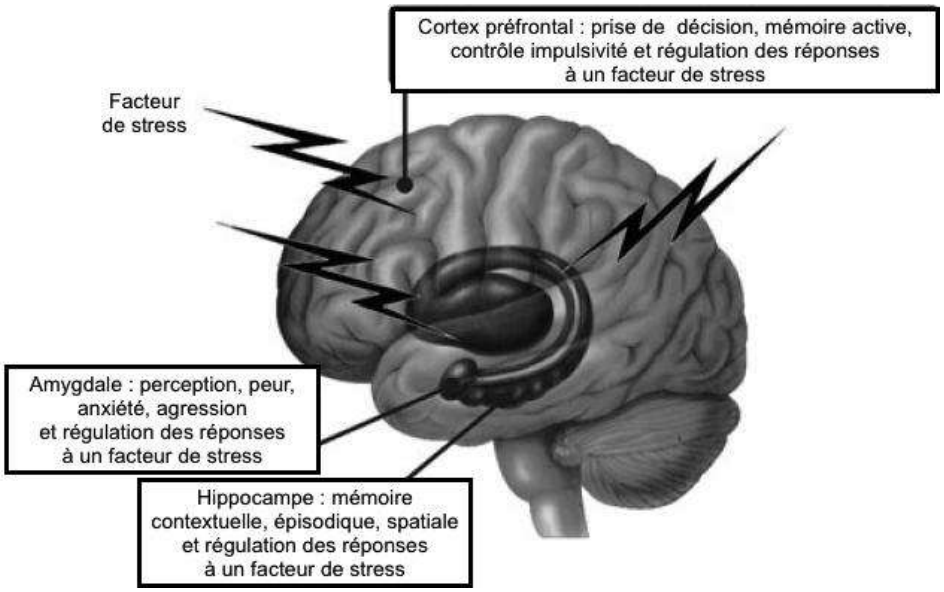


Figure 11- Localisation et fonctions clés des organes principaux du système limbique (d'après McEwen and Gianaros, 2010)

Chez le rat, l'ablation de l'hippocampe entraîne une augmentation de la concentration de corticostérone plasmatique dans des conditions basales, de stress et en post-stress (Sapolsky et al., 1984). Au contraire, l'activation de l'hippocampe induit une inhibition de l'axe HPA (Jacobson and Sapolsky, 1991).

L'implication du cortex préfrontal (CF) dans la régulation de l'axe HPA a été étudiée en générant des lésions sur différentes zones du CF l'empêchant de fonctionner normalement. La modulation de l'axe HPA par le CF est différente suivant la zone concernée. Chez le rat, lorsqu'une lésion dans le CF médian au niveau des divisions pré-limbiques s'ajoute à un agent stressant psychologique (ici une immobilisation), les taux d'ACTH et de corticostérone post-immobilisation sont plus élevés (Diorio et al., 1993). Cette potentialisation de l'effet des agents stressants n'est pas observée lorsque l'animal est exposé à de l'éther considéré comme un stress physique. L'activation du CF médian pré-limbique semble avoir un effet inhibiteur sur l'axe HPA. Au contraire, les rats ayant une lésion dans le CF infra-limbique ont un taux de corticostérone plus faible suite à une immobilisation par rapport aux rats contrôles immobilisés (Sullivan and Gratton, 1999). Ainsi, le CF infra-limbique, contrairement au CF pré-limbique, semble activer l'axe HPA.

Enfin, l'influence de l'amygdale sur la réponse de l'axe HPA est médiée par les noyaux centraux et médians (Dayas et al., 2001). Deux stress psychologiques différents chez le rat, le bruit et l'immobilisation, entraînent une activation des noyaux médians de l'amygdale. Un agent stressant physique, de type hémorragie ou injection d'IL-1β, augmente aussi le nombre de neurones CRH^+, mais, dans les noyaux centraux de l'amygdale. L'activation de l'amygdale par un stress psychologique, mais aussi physique, active l'axe HPA.

Un modèle a été développé chez l'homme pour analyser les changements d'activation du système limbique en réponse à un agent stressant psychologique : le MIST (« Montreal Imaging Stress Talk ») (Dedovic et al., 2005). Ce test consiste à exposer le sujet à un test mental d'arithmétique, couplé à de l'imagerie par résonnance magnétique, permettant d'enregistrer l'activité cérébrale. Le MIST induit une diminution de l'activité de l'hippocampe ainsi que du CF induisant une augmentation de la réponse au cortisol (Pruessner et al., 2008). Le modèle de stress psychologique (TSST, « Trier Social Stress Test ») reste le modèle le plus souvent utilisé. Au cours de ce test, l'individu est successivement soumis à: un temps d'attente à l'arrivée, une préparation à un oral, une présentation orale devant plusieurs personnes et des tests d'arithmétiques. Le TSST induit une augmentation de la concentration en ACTH et en cortisol salivaire et plasmatique (Kirschbaum et al., 1999).

Les rongeurs comme les porcs sont des animaux sociaux. Aussi, parmi les modèles de stress psychologique, on retrouve des modèles de stress psychosocial comme la défaite ou l'isolement. La défaite sociale consiste à placer un intrus dans le territoire d'un animal

dominant (Sgoifo et al., 1996) et l'isolement social consiste à placer l'animal seul dans une cage éloignée du groupe social (Bowers et al., 2008).

I-8- Les facteurs influençant les réponses à un agent stressant

Plusieurs facteurs influencent les réponses au stress, les plus connus étant le sexe, l'âge et les facteurs génétiques.

I-8-a- Effets du sexe

Des études épidémiologiques ont démontré des différences liées au sexe dans beaucoup de maladies associées au stress.

Dans les modèles de stress, ce dimorphisme sexuel n'est pas toujours observé. Par exemple, chez le rat, un bruit intense ne va pas induire de réponses différentes entre les mâles et les femelles alors qu'une immobilisation entraîne une sécrétion de corticostérone plus importante chez les mâles (Babb et al., 2013). L'effet inverse est observé après un stress chronique léger imprévisible sur 6 semaines chez le rat (Dalla et al., 2005). Dans ce cas, bien que le niveau basal de corticostérone ne diffère pas en fonction du sexe, le taux de corticostérone après l'agent stressant augmente significativement chez les femelles mais pas chez les mâles.

Des résultats similaires ont été démontrés chez l'homme. Alors que le niveau basal de glucocorticoïdes est moins important chez l'homme que chez la femme, l'augmentation de cortisol au cours du TSST est plus importante chez l'homme (Birkett, 2011). Cependant, cette différence n'est pas retrouvée avec des femmes en phase lutéale. Chez les hommes, le taux de testostérone avant TSST est associé négativement au taux de cortisol salivaire, et non plasmatique, après TSST (Stephens et al., 2016). Chez les femmes en phase folliculaire, le taux de progestérone avant TSST est associé négativement au taux de cortisol plasmatique.

D'autre part, les estrogènes modulent les réponses neuroendocriniennes et comportementales en présence d'un agent stressant de manière opposée suivant le type de récepteur aux estrogènes engagé. L'activation du récepteur aux estrogènes de type α augmente la stimulation de l'axe HPA alors que celle du récepteur de type β la diminue et diminue aussi les comportements associés à l'anxiété (Handa et al., 2012).

Pour s'affranchir au mieux de l'effet des niveaux d'hormones sexuelles sur les réponses à un agent stressant, les études sont plutôt réalisées chez des individus de même sexe.

I-8-b- Effets de l'âge

Différentes études ont montré que les réponses au stress étaient différentes suivant l'âge de l'individu.

L'adolescence est une période transitoire permettant de préparer l'individu à la vie d'adulte. Elle correspond aussi à l'acquisition de la maturité des organes sexuels. Le niveau basal de cortisol ainsi que la pression artérielle sont plus élevés chez les adolescents par rapport aux enfants. Cet effet est beaucoup plus prononcé lors d'une exposition à un agent stressant psychologique ou social (Stroud et al., 2009).

La vieillesse est caractérisée par le « stress-age syndrome ». Les personnes âgées présentent des concentrations plasmatiques d'ACTH et de cortisol très élevées et une quantité d'hormones sexuelles moins importante par rapport aux personnes plus jeunes. Elles présentent aussi une irrégularité dans l'excitabilité des structures du système limbique et de l'hypothalamus (Frolkis, 1993). Ces modifications sont associées à une mémoire défaillante, une augmentation des symptômes dépressifs et une plus grande vulnérabilité face à des situations de stress (Lupien et al., 2009).

I-8-c- Effets de la variabilité génétique

Les variations inter-individuelles dans la réponse au stress sont aussi dues, dans certains cas, à des variabilités génétiques. Chez l'homme, de nombreuses études ont analysé les SNPs (« single nucleotide polymorphism ») dans les gènes activés lors d'un stress. Les SNPs présents dans le gène codant les RG, la protéine *FKBP5* (« FKB506 binding protein 5 ») et l'enzyme *COMT* sont les plus étudiés.

NR3C1 est le gène codant les RG. Le changement d'un acide aminé (une sérine à la place d'une asparagine) au niveau du codon 363 du gène *NR3C1* augmente le rétrocontrôle négatif sur l'axe HPA lors d'un test de suppression à la dexaméthasone (Huizenga et al., 1998). Ainsi, la forme mutée du RG est plus sensible aux GC. Un autre polymorphisme a été observé dans le gène *NR3C1* au niveau des codons 22 et 23, appelé *ER22/23EK (*Koper et al., 1997*)*. La première mutation au niveau du codon 22 est silencieuse, la deuxième mutation au niveau du codon 23, AAG à la place de AGG, entraîne le changement d'une arginine par une lysine.

Ces deux mutations sont liées et induisent une résistance aux GC augmentant leur risque de développer une dépression (van Rossum et al., 2002).

Le gène *FKBP5* code une immunophiline associée à la protéine hsp90, connue pour se lier au RG et moduler la sensibilité des GC. Plusieurs polymorphismes ont déjà été décrits sur le gène *FKBP5* (Binder et al., 2004). Par exemple, le polymorphisme rs1360780 (remplacement d'une cytosine par une thymine dans l'intron 2) est associé à une diminution de l'hyperactivité de l'axe HPA au cours des épisodes dépressifs.

Des études ont aussi démontré l'implication de la mutation V158M (une méthionine à la place de la valine en position 158) de la protéine COMT dans les troubles majeurs de la dépression ainsi que dans les réponses aux antidépresseurs (Baune et al., 2008).

Les agents stressants activent deux axes principaux : l'axe HPA et l'axe SAM. L'activation de l'axe HPA induit la libération de GC qui se lient aux RG. L'activation de l'axe SAM entraîne la libération de catécholamines, Ad et NA qui se lient aux récepteurs adrénergiques. Les stress sont définis dans la littérature suivant leur durée ou leur type. Un stress aigu entraîne l'adaptation de l'organisme. Au contraire, un stress chronique parce qu'il induit une suractivation des axes HPA et SAM, peut entraîner des pathologies telles que les maladies cardiovasculaires ou la dépression. Les stress ayant une composante psychologique sollicitent le système limbique. Toutefois, la perception d'un agent stressant diffère d'un individu à l'autre notamment suivant son vécu, son environnement social, son âge, son sexe et sa prédisposition génétique.

Les effets du stress sur le système immunitaire sont de plus en plus étudiés. En effet, il est maintenant reconnu que les systèmes neuroendocrinien et immunitaire communiquent ensemble de manière bidirectionnelle. Les effets d'un agent stressant peuvent être appréhendés de deux manières différentes. Au niveau de l'animal entier, les réponses comportementales et/ou physiologiques sont analysées suite à l'exposition de l'animal à un agent stressant. Au niveau cellulaire, les fonctions des cellules immunitaires sont analysées suite à un traitement avec une ou plusieurs hormones du stress (Ad, NA et/ou GC).

II- Les principaux mécanismes de l'immunité

L'immunité repose sur un ensemble complexe de mécanismes de défense d'un organisme contre les éléments étrangers, en particulier les agents infectieux (bactéries, virus, champignons et parasites). La réponse immunitaire est divisée en 2 axes principaux : la réponse non spécifique qui constitue l'immunité innée, les cellules impliquées étant capables de détruire et d'ingérer un large éventail de pathogènes, et la réponse spécifique qui constitue l'immunité adaptative, les cellules reconnaissant un antigène spécifique et développant une réponse mémoire (Figure 12).

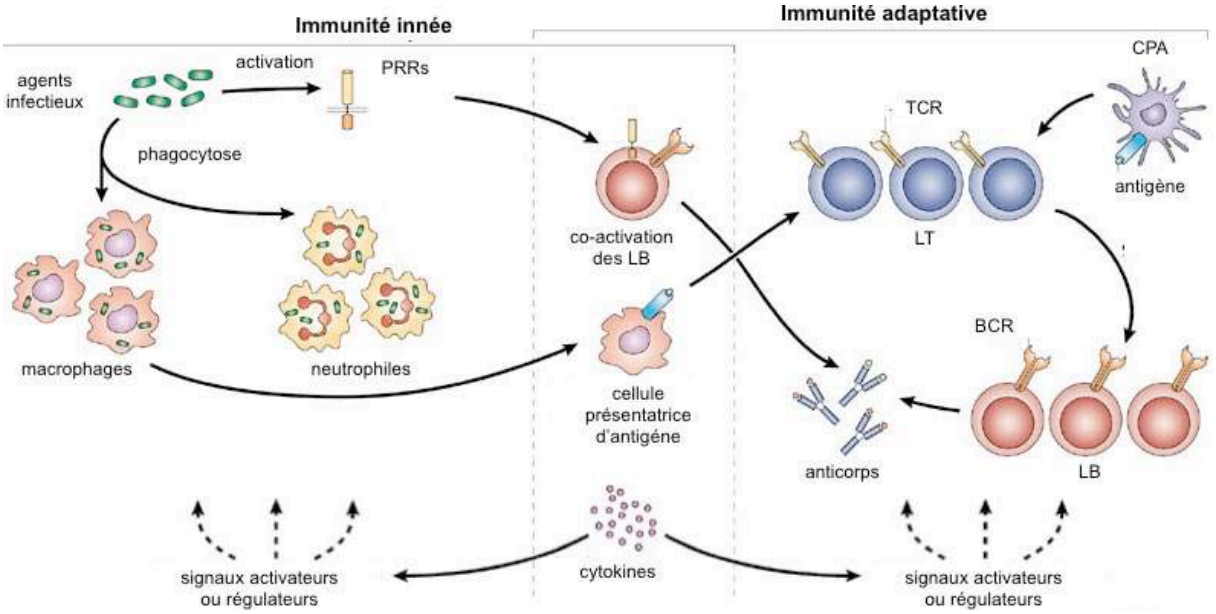


Figure 12- Principaux acteurs du système immunitaire (d'après Gregersen and Behrens, 2006).

II-1- Les barrières épithéliales

La première ligne de défense de l'organisme est constituée par les barrières épithéliales. Les trois principales interfaces entre l'organisme et le milieu extérieur sont la peau, le système gastro-intestinal et le système respiratoire. Les jonctions serrées sont les principales composantes structurales des épithéliums assurant la fonction de barrière physique épithéliale (Anderson and Itallie, 2009). Elles sont constituées de protéines intracellulaires et

transmembranaires qui lient le cytosquelette d'actine. Elles régulent le passage paracellulaire des ions, de l'eau et de plusieurs macromolécules pouvant traverser l'épithélium.

Les cellules épithéliales sont capables de produire plusieurs peptides antimicrobiens. Les principaux peptides antimicrobiens sont les défensines : α- et β-défensines (Suarez-Carmona et al., 2015). Ces défensines sont capables d'exercer une activité antimicrobienne sur un large spectre de bactéries, virus et champignons. Dans le cas des tractus respiratoire et digestif, l'épithélium de surface est protégé par du mucus. Les pathogènes peuvent franchir les barrières épithéliales si celles-ci sont endommagées.

II-2- Les cellules de l'immunité

Lorsque le pathogène franchit les barrières épithéliales, il se trouve confronté à des cellules immunitaires possédant des fonctions différentes.

Les neutrophiles constituent la majorité des leucocytes circulants chez l'homme (50-70% des leucocytes circulants totaux) et appartiennent historiquement à l'immunité innée (Kobayashi and DeLeo, 2009). Les neutrophiles sont recrutés au site de l'infection. Leur fonction principale dans les tissus est la phagocytose. Le pathogène phagocyté est alors détruit par une forte production de réactifs oxygénés et par des peptides antimicrobiens contenus dans les granules.

Les macrophages sont des cellules de l'immunité innée dont la fonction principale est également la phagocytose (Murray and Wynn, 2011). Contrairement aux neutrophiles, les macrophages résident dans les tissus et sont classés en sous-populations suivant leur localisation anatomique et leur phénotype, par exemple les cellules de Kupffer dans le foie, les ostéoclastes dans les os et les macrophages alvéolaires dans les poumons. De manière occasionnelle, les macrophages ont un rôle de cellule présentatrice d'antigène (CPA).

Les cellules NK (« Natural Killer ») représentent une sous-population de lymphocytes non B et non T qui contribuent à l'immunité innée (Mandal and Viswanathan, 2015). Les cellules NK possèdent une cytotoxicité naturelle vis-à-vis des cellules infectées par des virus et des cellules tumorales. La baisse d'expression des molécules du CMH-I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I) à la surface des cellules infectées ou tumorales est un des

mécanismes permettant aux cellules NK de les reconnaître par rapport aux cellules du soi. Une fois la cible reconnue, les cellules NK libèrent des protéases comme des granzymes A et B et des perforines qui entraînent rapidement l'apoptose de leur cible.

Les cellules dendritiques (DC) sont des CPA professionnelles à l'interface entre l'immunité innée et adaptative (O'Keeffe et al., 2015). Les DC immatures, présentes dans différents tissus, sont des cellules sentinelles. Lors de la capture d'un antigène, les DC migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles rencontrent les LT. Les DC établissent un contact avec les LT naïfs pour les activer.

Les lymphocytes sont des cellules de l'immunité adaptative. Les deux grandes familles de lymphocytes sont les lymphocytes T (LT) et les lymphocytes B (LB).

Les LT sont maturés dans le thymus, par un processus de sélection positive et négative, et sont divisés en 2 populations majeures suivant le type de TCR exprimé : les LTαβ qui possèdent un TCR (« T Cell Receptor ») avec des chaînes α et β et les LTγδ qui possèdent un TCR avec des chaînes γ et δ. Les 2 hétérodimères αβ ou γδ sont associés au complexe CD3 pour former le TCR (Chen, 2004).

Les LTαβ sont aussi divisés en 2 populations suivant l'expression des co-récepteurs CD4 ou CD8. Les LTαβ $CD4^+CD8^-$, aussi appelés LT auxiliaires, et les LTαβ $CD4^-CD8^+$, aussi appelés LT cytotoxiques, sont au départ des cellules naïves. Les LTαβ naïfs expriment le CD62L et le CCR7 leur permettant d'effectuer une immuno-surveillance dans les organes lymphoïdes secondaires à la recherche d'un antigène présenté par les CPA (De Rosa et al., 2001).

Les LTαβ $CD4^+CD8^-$ reconnaissent les antigènes présentés sur des molécules du CMH de classe II. Suite à cette reconnaissance, les LTαβ $CD4^+CD8^-$ prolifèrent et sécrètent des cytokines favorisant le développement des différentes réponses effectrices. Les LTαβ $CD4^-CD8^+$ reconnaissent les antigènes présentés sur les molécules du CMH de classe I. Une fois activés, ces lymphocytes comme les cellules NK sécrètent des perforines et des granzymes pour induire l'apoptose de la cellule cible. Les LT sont alors des cellules effectrices.

Après l'élimination d'un pathogène, la majorité des cellules effectrices meurent. Les cellules restantes sont différenciées en cellules mémoires permettant une immunité sur le long terme. Il existe deux grands types de cellules T mémoires : les cellules T mémoires centrales résidant dans les organes lymphoïdes secondaire et la moelle osseuse et les cellules T

mémoires effectrices présentes dans les tissus non lymphoïdes (Jameson and Masopust, 2009).

Les LTγδ n'expriment pas les co-récepteurs CD4 ou CD8. Contrairement aux LTαβ, les LTγδ reconnaissent des antigènes indépendamment des molécules du CMH. Si leurs cibles sont encore largement méconnus, il a été montré que certains sont notamment capables de reconnaître les molécules MICA et MICB (pour MHC class I-related molecule A or B) qui ont une structure apparentée aux molécules du CMH (Paul et al., 2014).

La différenciation des LB a lieu dans la moelle osseuse et leur maturation dans les organes lymphoïdes secondaires. Les LB expriment un BCR unique leur permettant de reconnaître un antigène spécifique. Chez l'homme, les anticorps anti-CD19, anti-CD20, anti-CD21 et anti-CD79α sont utilisés classiquement pour identifier les LB. Lorsque les LB rencontrent un antigène, ils se différencient soit en plasmocytes qui produisent et sécrètent des anticorps soit en LB mémoires. Les LB représentent un lien entre l'immunité innée et adaptative puisqu'ils ont aussi un rôle de CPA (Melchers, 2015).

II-3- Les Toll-Like Receptors

Les cellules immunitaires sont capables de reconnaître un signal de danger par l'intermédiaire des récepteurs de la famille des PRR (« Pattern Recognition Receptor »). Les PRR reconnaissent un grand nombre de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP). Ces récepteurs sont séparés en 3 grands groupes: (i) les récepteurs solubles (par exemple, la CRP « C-Reactive protein »), (ii) les récepteurs cytoplasmiques (les récepteurs de type RIG-I et de type NOD) et (iii) les récepteurs membranaires (les récepteurs de type lectine de type C et la famille Toll).

Les récepteurs de type RIG-1 ou de type NOD sont des récepteurs intracellulaires. Les récepteurs de type RIG-1 détectent spécifiquement les ARN viraux et les récepteurs de type NOD reconnaissent les constituants du peptidoglycane des bactéries tels que le dipeptide muramyl et l'acide-D-glutamyl-meso-diaminopimélique.

Les récepteurs de la famille des lectines de type C sont des lectines membranaires caractérisées par un domaine de reconnaissance des carbohydrates et réagissent avec des motifs comportant un mannose, un galactose ou un fructose.

Les TLR sont des protéines transmembranaires avec un domaine de fixation du ligand (extracellulaire ou intra-endosomal) contenant un nombre variable de motifs riches en leucine et un domaine cytoplasmique contenant un domaine TIR (« Toll IL-1 receptor ») (Yamamoto and Takeda, 2010). Les TLR ont été les premiers récepteurs découverts et sont aujourd'hui les mieux connus. Actuellement, 10 TLR ont été identifiés chez l'homme et 13 chez la souris. Ils sont subdivisés suivant leur localisation. Les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6 sont localisés à la membrane plasmique et les TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 sont situés à la membrane de l'endosome. Chaque TLR reconnaît un type de ligand spécifique (cf Table 2). Bien que les ligands spécifiques de TLR10 soient encore inconnus, son activation serait plutôt immunosuppressive. En effet, l'inactivation du TLR10 par un anticorps spécifique augmente la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induite par l'activation des TLR1/2 et TLR4 (Oosting et al., 2014; Jiang et al., 2016).

TLR	**Ligands**
TLR1 (+ TLR2)	Triacyl lipopeptides (bactéries)
TLR2	Lipoprotéines Peptidoglycanes (bactéries Gram +) Lipoarabinomannanes (mycobactéries)
TLR3	ARN double brin (virus)
TLR4	Lipopolysaccharides (bactéries Gram -)
TLR5	Flagellines (bactéries flagellées)
TLR6 (+TLR2)	Diacyl lipopeptides (mycobactéries)
TLR7 et TLR8	ARN simple brin (virus)
TLR9	ADN hypométhylé (bactéries)

Tableau 1- Les différents ligands des TLR humains

Les TLR sont sous forme de monomères au niveau membranaire. Une fois le ligand fixé, les TLR activés forment des dimères et changent de conformation pour rapprocher les domaines TIR des 2 TLR. Les TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 et TLR9 s'activent sous forme d'homodimères. Au contraire, le TLR2 activé forme des hétérodimères avec les TLR1 ou TLR6. L'activation des TLR par leur ligand spécifique permet d'activer plusieurs voies de signalisation (Figure 13).

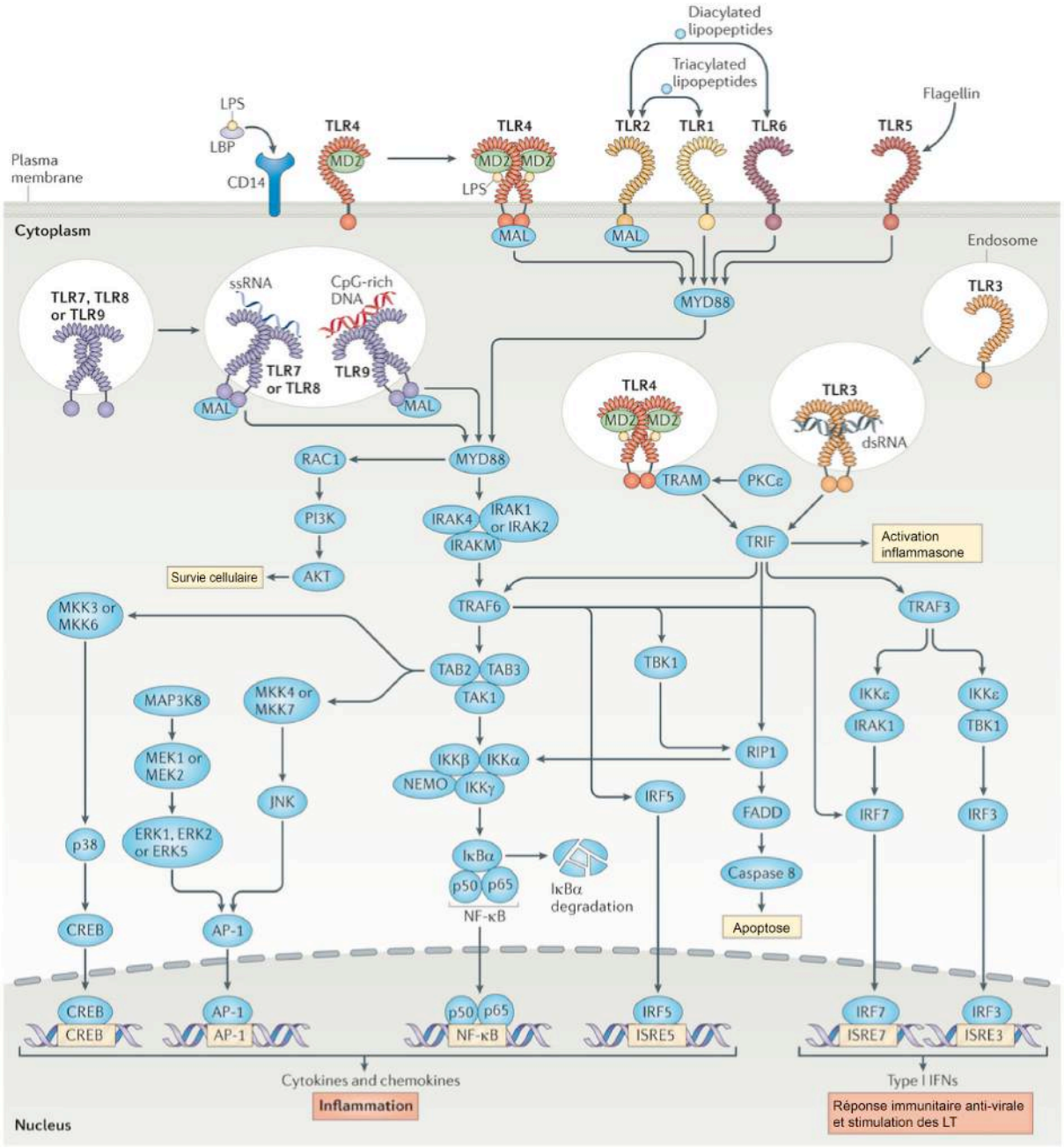


Figure 13- Voies de signalisation des différents TLR (d'après Gay et al., 2014).

Les 5 molécules adaptatrices sont MyD88, TRIF, MAL (ou TIRAP), TRAM et plus récemment SARM (O'Neill and Bowie, 2007). Ces molécules adaptatrices représentent le lien entre l'activation du TLR et les protéines kinases intracellulaires activant des facteurs de transcription.

MyD88 est la molécule adaptatrice de tous les TLRs exceptés le TLR3 et certains signaux du TLR4. Une fois le TLR activé, MyD88 s'associe avec le domaine TIR du TLR par l'intermédiaire de la molécule MAL et recrute les protéines kinases IRAK-1 et IRAK-4. Ces protéines kinases induisent une cascade d'activation permettant d'activer différents facteurs

de transcription tels que NF-κB, CREB et AP-1, impliqués dans la transcription des gènes codant les cytokines et les chimiokines inflammatoires.

MyD88 est également requis pour l'induction de la transcription des gènes de la famille des interférons de type I par les TLR7, TLR8 et TLR9. TRAF6 activé par le complexe IRAK-1/IRAK-4 active directement les facteurs de transcription IRF5 et IRF7, impliqués dans la transcription des gènes codant l'interféron α et β.

TRIF est la molécule adaptatrice utilisée par le TLR3 ainsi que le TLR4 endosomal associé à la molécule TRAM. L'activation de TRIF permet l'activation des facteurs de transcription NF-κB et IRF5 par l'intermédiaire de TRAF6. Elle induit aussi l'activation des facteurs de transcription IRF7 et IRF3.

SARM est la dernière molécule adaptatrice identifiée à ce jour. SARM est caractérisée comme un régulateur négatif de l'immunité, notamment en inhibant les molécules adaptatrices TRIF et MyD88 (Peng et al., 2010).

La reconnaissance des pathogènes par les TLR permet notamment aux phagocytes d'induire leur internalisation.

II-4- La phagocytose

La phagocytose joue un rôle important dans les mécanismes de défense innée et adaptative (Gordon, 2016). L'internalisation du pathogène est possible grâce aux divers récepteurs présents sur les phagocytes, notamment sur les macrophages (Underhill and Ozinsky, 2002).

Le pathogène peut être opsonisé par les immunoglobines de type G (IgG) et/ou par les protéines du complément, respectivement reconnues par les récepteurs Fc (FCγRs) et par les récepteurs au complément (CR1, CR3 et CR4). Un pathogène non opsonisé peut également être directement reconnu par d'autres récepteurs : (i) les récepteurs de type lectine de type C comme la dectine-1 ou le récepteur au mannose (CD206), (ii) les récepteurs « éboueurs» (« scavenger receptor ») comme MARCO et (iii) des récepteurs possédant des répétitions riches en leucine par exemple le CD14.

Une fois le pathogène reconnu par les différents récepteurs, il est internalisé, ce qui s'accompagne de l'activation de plusieurs voies de signalisation entrainant le réarrangement du cytosquelette et l'extension de la membrane plasmique. Les principales molécules impliquées dans l'internalisation sont la PI3K, la phospholipase C, les Rho GTPase et la

protéine kinase C. Suite à l'internalisation, le phagosome formé fusionne avec les lysosomes pour former le phagolysosome. Dans le phagolysosome, le phagocyte met en place des mécanismes pour détruire le pathogène (Figure 14).

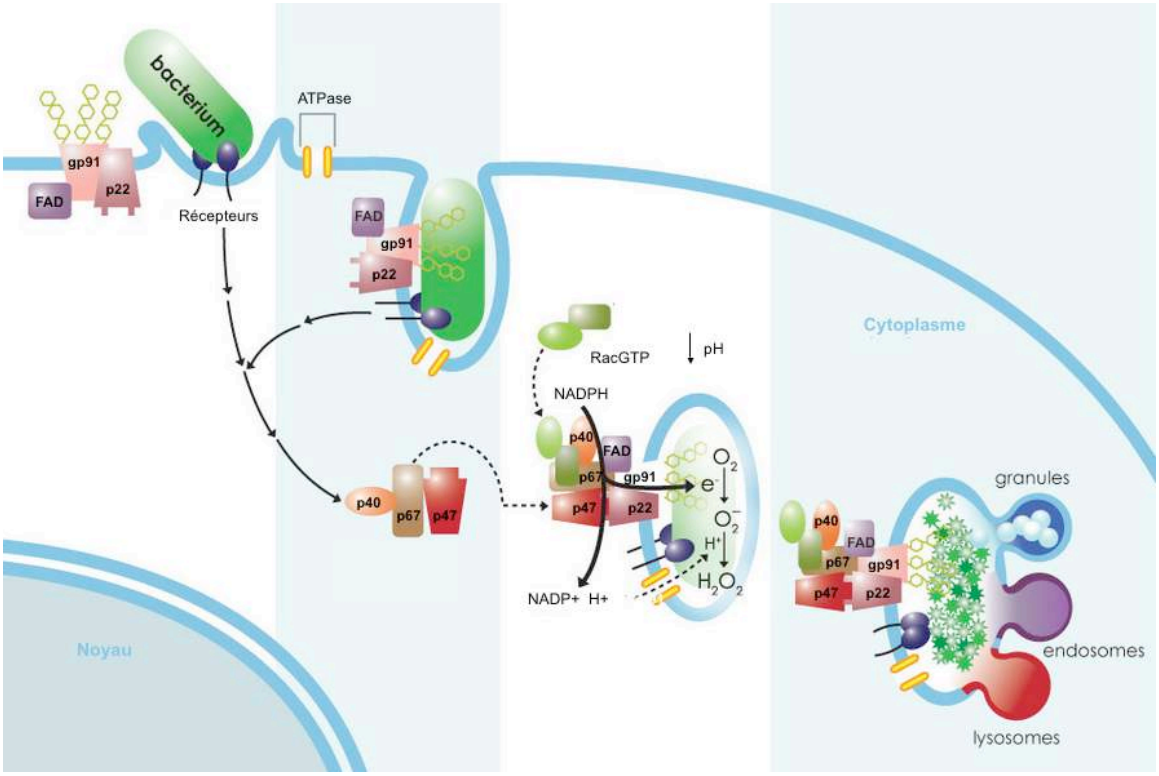


Figure 14- Mécanisme de destruction d'une bactérie par un phagocyte (d'après cyamanchem.com)

Dans un premier temps, le phagocyte produit des ions superoxydes générés par la NADPH oxydase : c'est le « burst » oxydatif (Nunes et al., 2013). La NADPH oxydase est composée de 5 protéines : $gp91^{PHOX}$ et $p22^{PHOX}$ sont localisées à la membrane et les 3 protéines $p40^{PHOX}$, $p47^{PHOX}$ et $p67^{PHOX}$ forment un complexe localisé dans le cytoplasme. Lorsque le pathogène est internalisé, $p47^{PHOX}$ est phosphorylée suite à l'activation de la RhoGTPase Rac-2 et le complexe cytoplasmique migre à la membrane phagosomale. La formation de réactifs oxygénés par la NADPH oxydase ainsi que l'acidification du phagolysosome par l'influx de protons par la V-ATPase désorganisent et dénaturent le pathogène.

Les antigènes du pathogène peuvent ensuite être apprêtés sur les molécules du CMH de classe I et/ou II par les phagocytes (rôle de CPA).

II-5- L'apprêtement et la présentation des antigènes

Les DC sont les CPA les plus efficaces pour initier une réponse immunitaire adaptative (Mantegazza et al., 2013).

Les peptides endogènes sont classiquement présentés sur les molécules du CMH de classe I. Ce mécanisme est commun à toutes les cellules nucléées qui de ce fait présentent en permanence des peptides du soi, ou du non-soi en cas d'infection. Les voies de présentation classe I sont résumées sur la figure 15.

Les molécules du CMH de classe I sont composées de deux chaines, une chaine α lourde et une chaine légère invariante, la β2 microglobuline (Peaper and Cresswell, 2008). Les peptides de 8 à 11 acides aminés présents dans le cytoplasme, proviennent des protéines dégradées par le protéasome, tandis que les molécules du CMH de classe I sont produites dans le réticulum endoplasmique (RE). La chaine α des molécules du CMH-I est liée à la calnexine jusqu'à sa liaison avec la chaine β2 microglobuline. Cette liaison permet la libération de la calnexine et le recrutement du complexe calréticuline/ERp57 (protéines chaperonnes) ainsi que du transporteur TAP (« Transporter associated with Antigen Processing ») associé à la tapasine qui assure le maintien de la proximité entre TAP et les molécules de classe I. Le transporteur TAP assure ensuite le transport des peptides du cytoplasme vers la lumière du RE. Une fois dans le RE, en fonction de leur affinité, ces peptides se lient aux molécules du CMH de classe I. Enfin, les complexes CMH-I/peptide sont transportés à la surface de la cellule.

Les CPA sont des cellules capables aussi de présenter des peptides exogènes sur les molécules de CMH de classe I : c'est la présentation croisée ou « cross-présentation ».

Deux modèles intracellulaires ont été décrits, souvent définis comme les voies « cytosolique » et « vacuolaire » (Joffre et al., 2012). Dans la présentation croisée par voie « cytosolique », les peptides exogènes endocytés sont dégradés par le protéasome puis transportés dans la lumière du RE et apprêtés sur les molécules du CMH de classe I. Dans la voie « vacuolaire », les molécules du CMH de classe I entrent dans les compartiments endosomaux contenant les peptides exogènes. Les peptides lient directement les molécules du CMH-I sans l'intervention du transporteur TAP.

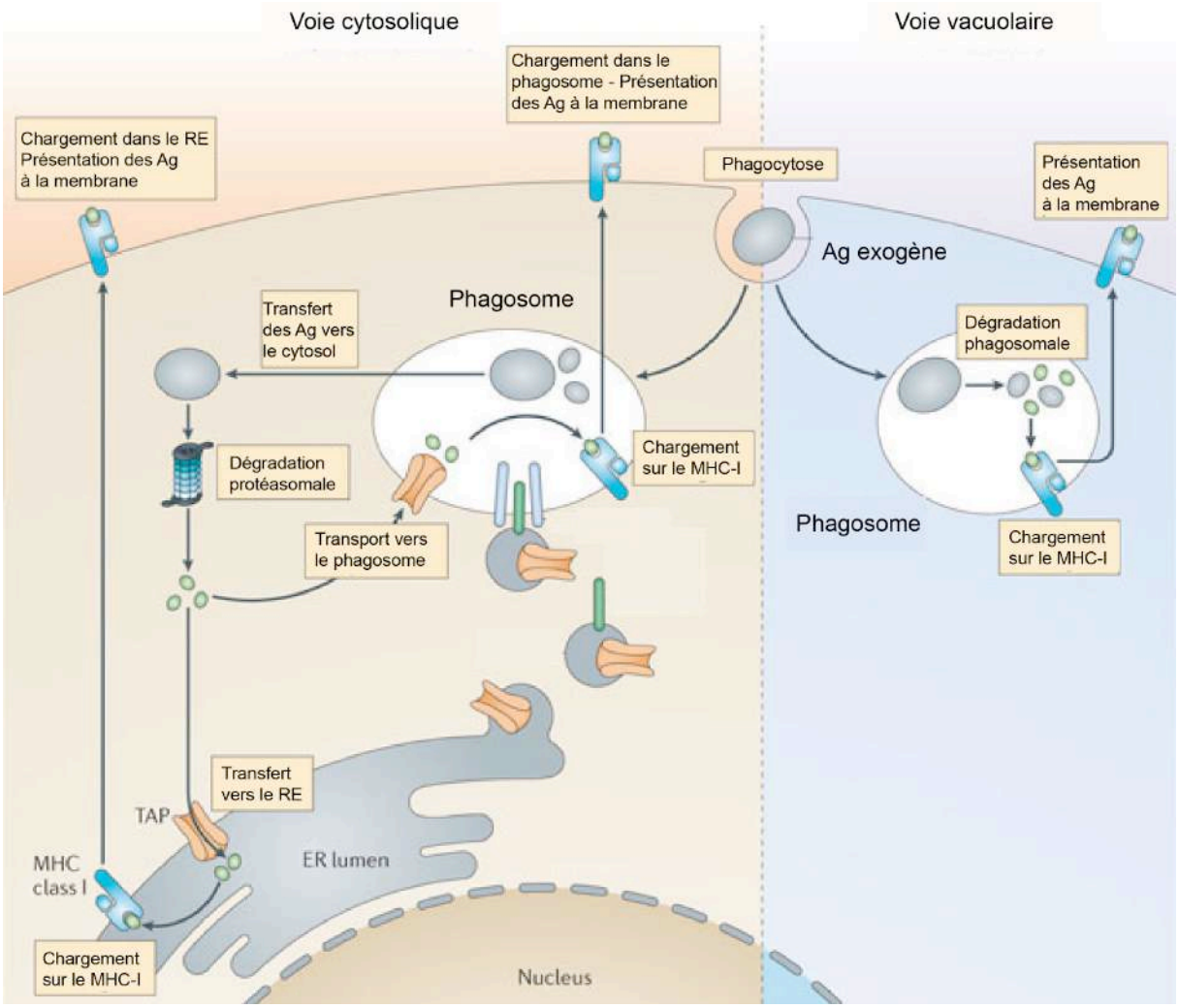


Figure 15- Voies de présentation des antigènes par les molécules du CMH de classe I (d'après Joffre et al., 2012). Ag, antigène et RE, réticulum endoplasmique.

Les peptides exogènes, provenant du milieu extracellulaire, sont quant à eux généralement captés, endocytés et présentés sur les molécules du CMH de classe II, permettant l'activation des LT $CD4^+$ (Figure 16).

Les molécules du CMH de classe II sont composées d'une chaine α et d'une chaine β (Roche and Furuta, 2015). Dans le RE, la chaîne invariante (Ii) est liée aux molécules de classe II au niveau du sillon de liaison des peptides. L'assemblage des chaines α, β et invariante facilite la sortie des molécules du CMH de classe II du RE puis ces complexes naviguent *via* le réseau Trans-Golgien vers la membrane plasmique du RE. Une fois à la membrane du RE, les complexes sont endocytés selon un processus clathrine-dépendant pour former une vésicule endosomale. Cette vésicule fusionne ensuite avec une autre vésicule endosomale contenant des peptides dégradés. Dans ces corps multi-vésiculaires (MIIC), les protéases présentes clivent la chaine invariante Ii pour ne laisser que le fragment CLIP.

L'enzyme HLA-DM (protéine fortement homologue aux molécules de classe II) retire le fragment CLIP du complexe α/β, autorisant la fixation des peptides endosomaux dans le sillon du CMH de classe II. Une fois stabilisés, les complexes CMH de classe II/peptide sont transférés à la membrane plasmique.

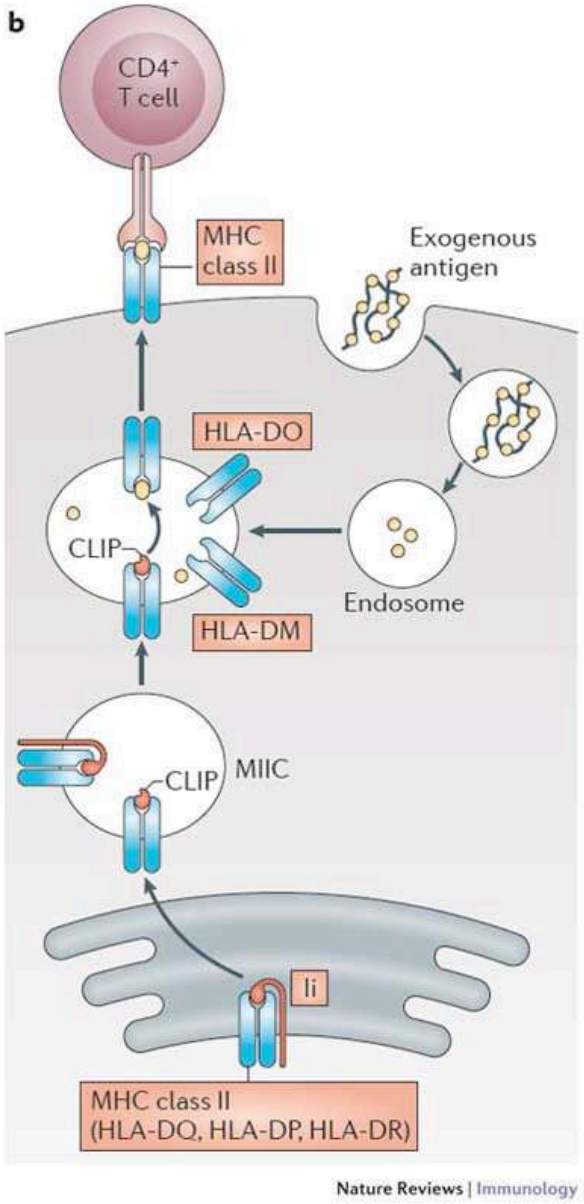


Figure 16- Voie de présentation des antigènes par les molécules du CMH de classe II (d'après Kobayashi and van den Elsen, 2012).

Parallèlement à l'apprêtement des peptides sur les molécules du CMH de classe I ou du CMH de classe II, les DC migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour aller à la rencontre des LT. Les DC sont les cellules les plus efficaces dans ce processus puisqu'elles sont capables d'activer des LT naïfs (Teijeira et al., 2014). Durant leur migration, les DC

surexpriment le récepteur CCR7 alors que l'expression du récepteur CCR6 est diminuée (Dieu et al., 1998). Le CCR7 reconnaît les chimiokines CCL19 et CCL21 produites par les LT présents dans les organes lymphoïdes secondaires (Förster et al., 1999). Les DC vont en plus exprimer les molécules de co-stimulation CD80 et CD86. Les DC sont alors matures.

II-6- La synapse immunologique

L'activation des LT par les DC matures nécessite la mise en place de la synapse immunologique et requiert trois signaux indispensables (Dustin, 2014) (figure 17).

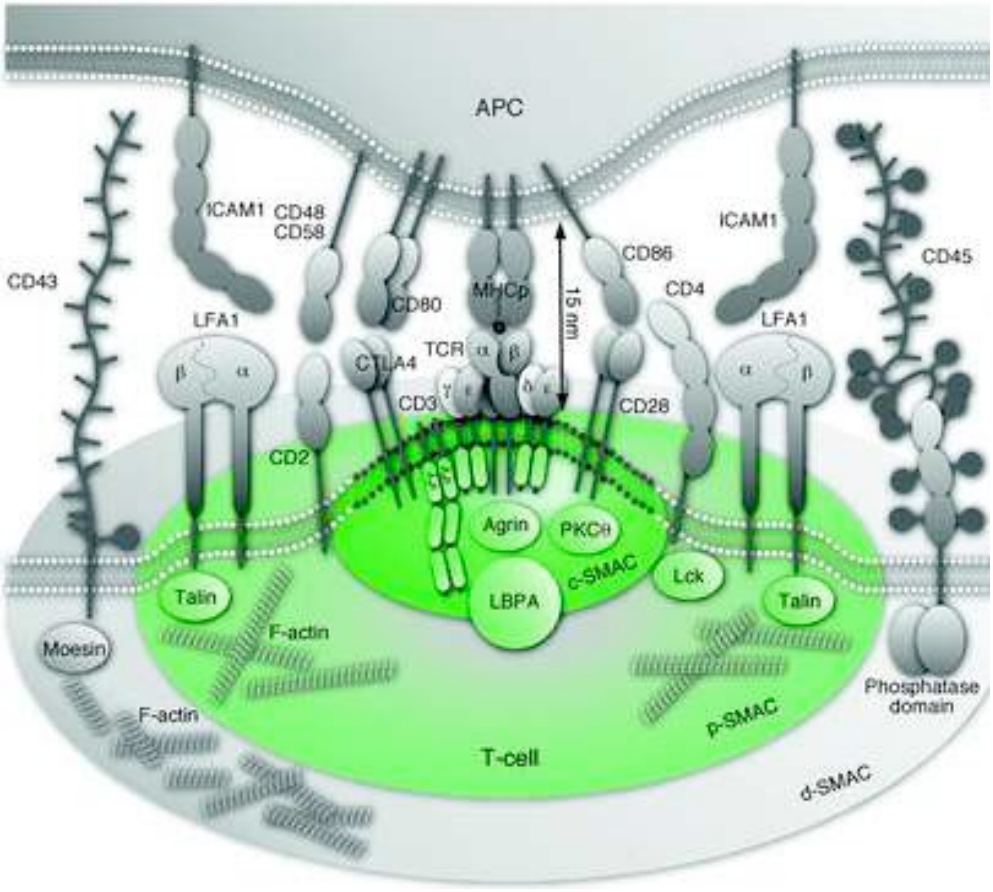


Figure 17- Synapse immunologique entre une cellule présentatrice d'antigène et un LT (d'après Yokosuka and Saito, 2010). APC, cellule présentatrice d'antigènes.

Les cellules T naïves interagissent avec une DC par le TCR spécifique d'un peptide antigénique présenté par les molécules du CMH de classe I (interaction DC/LT $CD8^+$) ou du CMH de classe II (interaction DC/LT $CD4^+$), c'est le signal 1. L'affinité entre le TCR et le complexe CMH-peptide est renforcée par les co-récepteurs. Le co-récepteur CD4 interagit

avec le domaine β2 des molécules du CMH de classe II alors que le co-récepteur CD8 interagit avec le domaine α3 des protéines du CMH de classe I. L'intensité comme la durée de cette interaction TCR/CMH-peptide sont augmentées par des molécules d'adhésion LFA-1, CD2/ICAM-1 et LFA-3.

Toutefois, le signal 1 seul ne suffit pas pour induire une expansion clonale ou une différenciation des LT. Le deuxième signal est la co-stimulation assurée par des représentants de 2 grandes familles de molécules : la famille des immunoglobulines et la famille des récepteurs au TNF (Bakdash et al., 2013).

Parmi les molécules de co-stimulation de la famille des immunoglobulines, les premières et les plus importantes caractérisées sont le CD28 sur les cellules T naïves et ses ligands, le CD80 et le CD86 sur les CPA. L'engagement du CD28 induit la prolifération des LT, l'augmentation de la sécrétion d'IL-2 par la DC et la survie des LT. La molécule CTLA-4 pour « Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 », un homologue du CD28, se lie aussi aux ligands CD80/CD86 avec une meilleure affinité que le CD28. Le CTLA-4 inhibe la prolifération et la progression du cycle cellulaire des LT ainsi que la synthèse d'IL-2 par les CPA. Un autre couple de molécules de co-stimulation ICOS/ICOS-Ligand (« Inducible T cell COStimulator ») est aussi impliqué dans la prolifération des LT. L'expression d'ICOS par les LT nécessite une activation du TCR et l'engagement de la molécule de co-stimulation CD28. La molécule PD-1 (« programmed cell death-1 ») exprimée sur les LT se lie aux ligands PD-L1 et PD-L2 présents sur les CPA. L'interaction entre PD-1 et et ses ligands altère la survie cellulaire et induit l'apoptose des LT.

Le couple de molécules de co-stimulation CD40/CD40L est le premier à avoir été identifié dans la famille des récepteurs au TNF. La liaison de CD40 présent sur les CPA avec le CD40L exprimé sur les LT activés augmente l'expression des molécules du CMH et d'adhésion et stimule la production d'IL-12 par les CPA. Le couple OX-40/OX-40L fait aussi partie de la famille des récepteurs au TNF. Le ligand OX-40L est exprimé sur les CPA après la liaison du CD40 avec le CD40L. La molécule OX-40 n'est exprimée que sur les LT activés pas sur les LT naïfs ou mémoires.

Toutes ces molécules sont les molécules les plus importantes dans le signal de co-stimulation, cependant d'autres molécules ont été décrites plus récemment (Table 3) (Chen and Flies, 2013).

Molécules		Rôles	Familles
CPA	**LT**		
CD70	CD27	Stimulation	Récepteurs au TNF
CD137L	CD137		
GITRL	GITR		
HVEM	LIGHT		
CD30L	CD30		
GAL9	TIM3	Inhibition	
HVEM	BTLA		Immunoglobulines

Tableau 2- Autres molécules de co-stimulation. BTLA, B- and T- lymphocyte attenuator ; GAL9, galectin-9 ; GITR, glucocorticoid-induced TNF-receptor related protein ; HVEM, herpes virus-entry mediator et TIM3, T cell immunoglobulin and mucin protein 3.

Les signaux 1 et 2 sont suffisants pour induire l'activation des lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques. Les LT cytotoxiques sécrètent principalement deux molécules induisant l'apoptose de la cellule cible : les perforines et les granzymes.

Le troisième signal est apporté par les cytokines sécrétées par les DC et est nécessaire à la différenciation des LT $CD4^+$.

II-7- La polarisation des LT $CD4^+$

Il est admis que la présence d'IFN-γ et d'IL-12 dans le milieu permet la différenciation des LT CD4+ en Th1. Les cellules Th1 sécrètent elles-mêmes de l'IFN-γ, de l'IL-2 et du TNF-α et expriment le facteur de transcription T-bet. Les cellules Th1 sont impliquées dans les réponses immunitaires à médiation cellulaire et ont été associées à plusieurs maladies auto-immunes telles que le diabète de type I, la sclérose en plaque ou l'arthrite rhumatoïde.

La présence d'IL-4 dans l'environnement induit, quant à elle, une différenciation des LT $CD4^+$ en Th2. Les cellules Th2 sécrètent les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 et expriment le facteur de transcription GATA-3. Les cellules Th2 ont un rôle critique dans la défense de l'organisme contre les parasites et sont impliquées dans des pathologies telles que l'asthme.

Depuis la découverte de la dichotomie Th1 / Th2, de nouvelles sous-populations de LT auxiliaires sont constamment décrites (Figure 18)

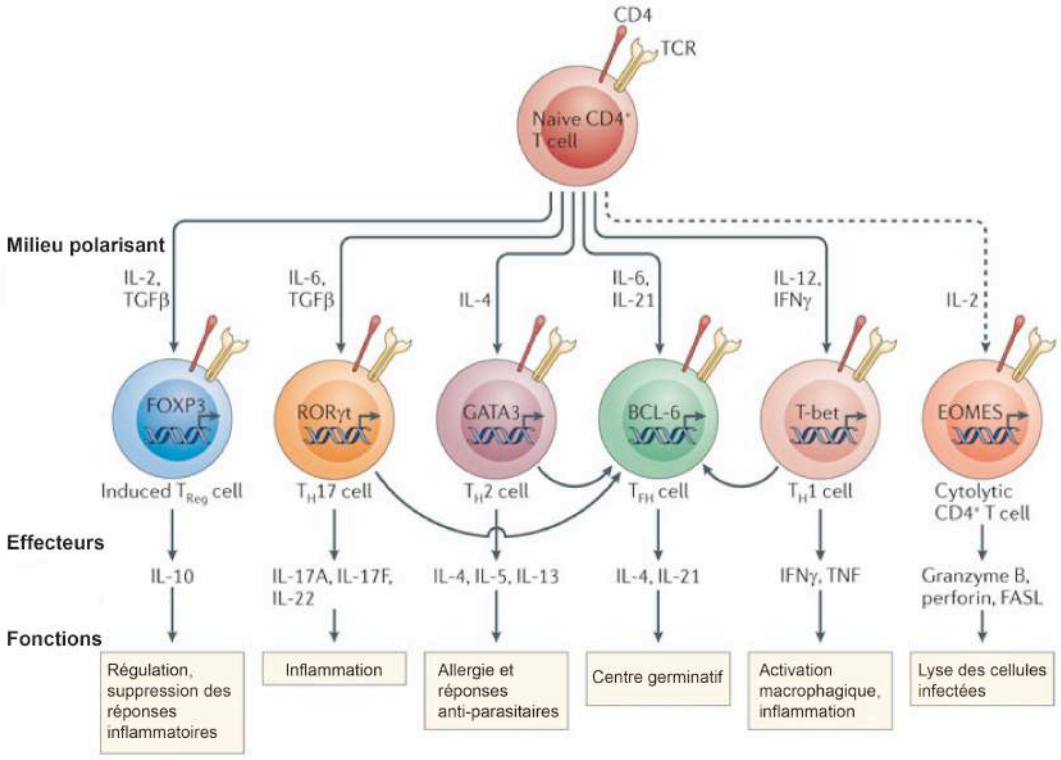


Figure 18- Les différentes polarisations du lymphocyte T CD4$^+$ naïf (d'après Swain et al., 2012).

La différenciation des LT CD4$^+$ en cellules Th17 dépend de la sécrétion par les DC des cytokines TGF-β et IL-6 (Miossec et al., 2009). Les cellules Th17 sécrètent les cytokines de la famille de l'IL-17, notamment l'IL-17A et l'IL-17F, de l'IL-21 et de l'IL-22 et expriment le facteur de transcription RORγT. Les cellules Th17 sont associées aux maladies auto-immunes et à l'élimination des pathogènes extracellulaires.

Les cellules T auxiliaires folliculaires (LTfh) sont localisées dans les follicules des organes lymphoïdes et plus précisément dans les centres germinatifs contenant les LB (Tangye et al., 2013). La sécrétion de cytokines comme l'IL-6 ou l'IL-21 par les CPA permet la différenciation des LT naïfs en LTfh. Les LTfh expriment le récepteur CXCR5 ainsi que le facteur de transcription Bcl-6 et sécrètent de l'IL-4 et de l'IL-21 permettant la différenciation et l'activation des LB.

Les lymphocytes T régulateurs induits (iTreg) se développent dans la périphérie à partir de LT naïfs sous l'influence de l'IL-2 et du TGF-β sécrétés par les DC. Les iTreg sécrètent des cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 et le TGF-β et jouent un rôle actif dans le

maintien de l'homéostasie immunitaire en limitant les réponses excessives et inappropriées ainsi que dans la prévention des maladies auto-immunes (Workman et al., 2009). Comme les cellules T régulatrices naturelles (nTreg) produites dans le thymus, elles co-expriment les molécules CD4 et CD25 ainsi que le facteur de transcription Foxp3.

Deux nouvelles populations de LT présentant des fonctions immunosuppressives ont été décrites : les cellules Th3 et les cellules Tr1 (Hall, 2015). Ces 2 types de cellules n'expriment pas le marqueur CD25. Les cellules Th3 expriment le facteur de transcription Foxp3, produisent du TGF-β et sont impliquées dans le maintien de la tolérance au niveau des muqueuses. Au contraire, les cellules Tr1 n'expriment pas le facteur de transcription Foxp3 et sécrètent de l'IL-10.

II-8- Les lymphocytes B

L'activation des LB peut être thymo-indépendante ou thymo-dépendante (LeBien and Tedder, 2008). Les antigènes impliqués dans la voie thymo-indépendante sont séparés en 2 groupes : les composants des parois bactériennes (dont le prototype est le LPS) et les polymères à structure répétitive comme les polysaccharides. Ces antigènes sont capables d'activer les LB sans la coopération des LT $CD4^+$. Les LB se différencient alors en plasmocytes produisant une grande quantité d'IgM. À forte concentration, le LPS induit l'activation polyclonale des LB.

En revanche, l'activation des LB par voie thymo-dépendante requiert la présence de DC folliculaires et de LT $CD4^+$ Tfh (den Haan et al., 2014) (Figure 19).

Les DC folliculaires (DCF) présentes dans les follicules lymphoïdes sont des cellules piégeant les antigènes. Elles capturent et retiennent les complexes antigènes/anticorps par l'intermédiaire des récepteurs Fc et des récepteurs au complément. Le complexe immun peut rester associé aux DCF durant quelques mois. Les DCF présentent alors l'antigène complet aux LB permettant de sélectionner les cellules possédant des BCR de haute affinité pour l'antigène. Si l'affinité du BCR pour l'antigène est très faible, les LB entrent en apoptose.

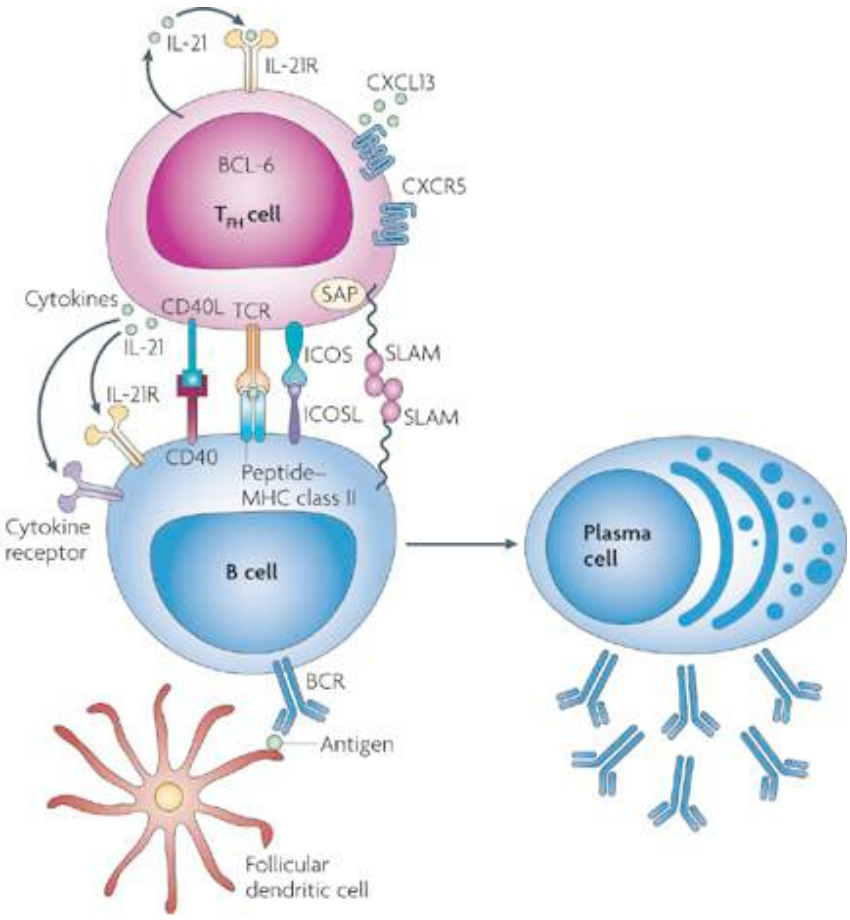


Figure 19- Activation des lymphocytes B par la voie thymo-dépendante (d'après King, 2009). plasma cell, plasmocyte ; follicular dendritic cell, cellule dendritique folliculaire ; TFH cell, lymphocyte auxilliaire folliculaire

L'antigène est ensuite internalisé et apprêté sur les molécules du CMH de classe II des LB qui deviennent donc des CPA. La stabilité du complexe peptide/CMH de classe II est renforcée par la présence des co-récepteurs CD19, CD21 et CD81. Le complexe peptide/CMH-II est reconnu par le TCR d'un LTfh. Le CD40L présent sur la cellule Tfh interagit avec la molécule CD40 du LB, c'est le signal de co-stimulation. Comme décrit précédemment, la cellule Tfh sécrète de l'IL-21 et de l'IL-4 induisant la prolifération des LB ainsi que la production d'anticorps. Les LB se différencient en cellules mémoires ou en plasmocytes.

III- Le concept de la psychoneuroimmunologie

La psychoneuroimmunologie, terme utilisé pour la première fois par Robert Ader en 1981, définit maintenant une discipline. Elle vise l'étude des interactions entre le comportement, les fonctions neuronales et endocriniennes et le système immunitaire (Ader et al., 1995). La relation bidirectionnelle entre les systèmes neuroendocrinien et immunitaire est objectivée par différents points : (1) un agent stressant influence les réponses immunitaires, (2) les organes lymphoïdes sont innervés par les fibres nerveuses noradrénergiques, (3) les cellules immunitaires possèdent des récepteurs aux hormones et neurotransmetteurs, enfin (4) l'état immunologique d'un organisme peut avoir des conséquences sur les comportements (Figure 20).

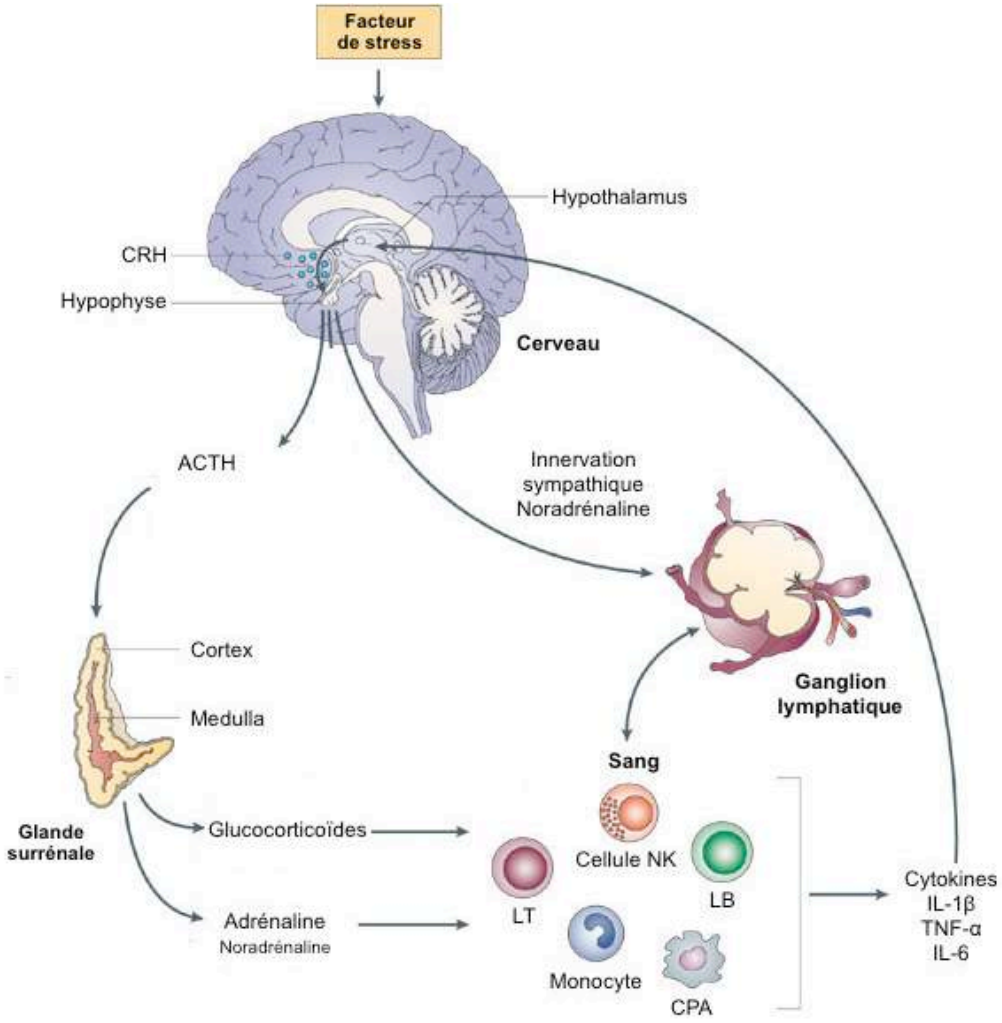


Figure 20- Voies de communication entre les systèmes neuroendocrinien et immunitaire (d'après Glaser and Kiecolt-Glaser, 2005).

III-1- Mise en évidence du contrôle neuroendocrinien de l'immunité

Dans les années 1970, Robert Ader étudie les effets d'une aversion gustative conditionnée pour une saveur chez le rat (Ader, 1974). L'expérience a consisté à faire boire à des rats une solution contenant 0,1 % de saccharine (stimulus conditionné) suivi d'une injection de cyclophosphamide (CY ; stimulus inconditionné). Le CY est un puissant immunosuppresseur entraînant des troubles gastro-intestinaux (nausées, vomissements, etc.). Lors d'une nouvelle présentation de la solution sucrée, les rats conditionnés présentaient un comportement d'évitement et, de manière surprenante, certains rats mourraient. Ces rats semblaient être plus susceptibles aux pathogènes environnants.

Pour déterminer si l'aversion gustative conditionnée modifiait les réponses immunitaires, des hématies de moutons (HM) ont été injectées dans les différents groupes de rats (Ader and Cohen, 1975). Le titrage d'anticorps anti-HM a été effectué 9 jours après le premier conditionnement. A J9, la quantité d'anticorps anti-HM n'est pas différente entre les rats non conditionnés (seulement une injection de CY à J0) et les rats juste conditionnés (solution sucrée puis CY à J0). En revanche, une nouvelle présentation de la solution sucrée entraîne une diminution de la quantité d'anticorps anti-HM spécifiquement chez les rats conditionnés. Ainsi, le conditionnement comportemental a modifié les réponses immunitaires.

Quelques années plus tard, Robert Ader et Nicholas Cohen ont répété ces expériences d'aversion gustative conditionnée sur des souris développant une maladie auto-immune, le lupus érythémateux systémique (Ader and Cohen, 1982). La présentation d'une solution sucrée chez les souris conditionnées retarde le développement du lupus et la mortalité.

Ces résultats vont contribuer à l'essor d'une nouvelle discipline : la psychoneuroimmunologie.

III-2- Vascularisation et innervation des organes lymphoïdes

Les organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse et thymus) et secondaires (rate et ganglions lymphatiques) sont innervés par des fibres nerveuses noradrénergiques (Felten et al., 1987) (Figure 21).

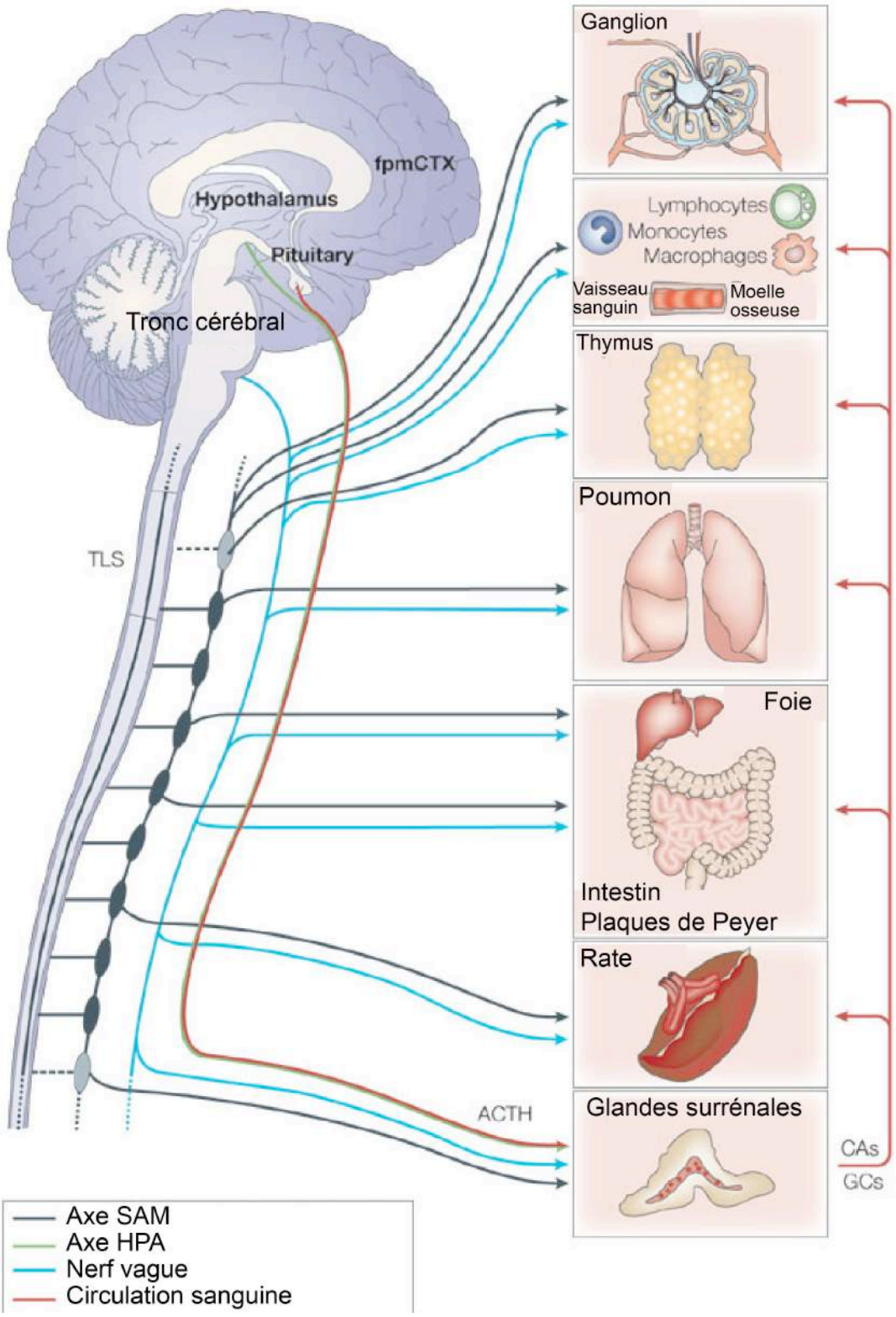


Figure 21- Voies descendantes du contrôle de l'immunité par le système neuroendocrinien (d'après Meisel et al., 2005). CA, catécholamines ; fpmCTX, cortex frontal pré-moteur ; GC, glucocorticoïdes ; Pituitary, hypophyse et TLS, système thoraco-lombaire.

III-2-a- La moelle osseuse

La moelle osseuse est un organe lymphoïde primaire produisant des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces cellules sont à l'origine de toutes les cellules du sang. La présence de différents facteurs de croissance dans la moelle osseuse permet la différenciation des CSH en différents progéniteurs donnant naissance aux différents types cellulaires (érythrocytes, leucocytes et plaquettes). L'analyse de l'innervation noradrénergique de la moelle osseuse a été effectuée par immunohistochimie avec un anticorps anti-tyrosine hydroxylase (Tabarowski et al., 1996). Les fibres noradrénergiques se ramifient pour entrer à l'intérieur des os avec les artérioles nourricières. Au niveau de la moelle osseuse, la majorité des fibres noradrénergiques sont en contact avec les CSH. Une faible quantité de fibres est retrouvée dans le parenchyme de la moelle osseuse. L'administration *in vivo* de 6-OHDA (6-hydroxydopamine) permet de diminuer le taux de NA dans les organes lymphoïdes (Williams et al., 1981). En effet, injecté par voie *ip* ou *iv*, la 6-OHDA induit une sympathectomie chimique en détruisant les fibres nerveuses noradrénergiques terminales sans affecter les neurones noradrénergiques centraux du cerveau puisque la 6-OHDA ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique (Kostrzewa and Jacobowitz, 1974). Cette sympathectomie chimique induit une diminution de la cellularité de la moelle osseuse (Afan et al., 1997). Les fibres noradrénergiques régulent la migration des cellules immunitaires de la moelle osseuse vers la périphérie.

III-2-b- Le thymus

Le thymus est un organe lymphoïde primaire bilobé composé d'un cortex contenant la majorité des thymocytes immatures et d'une medulla contenant des cellules plus matures. Le thymus permet la différenciation et la maturation des CSH issues de la moelle osseuse en LT. Le thymus est très innervé par les fibres noradrénergiques (Bellinger et al., 1988). Une méthode d'immunofluorescence a été utilisée dans cette étude. Le marquage avec de l'acide glyoxylique (AG) permettant de visualiser les catécholamines a été réalisé sur des coupes de thymus. L'AG en présence de catécholamines produit de la fluorescence visible par microscopie. Les fibres noradrénergiques entrent dans le thymus avec le système vasculaire. Le plexus nerveux traverse la capsule et arrive directement dans le cortex. Les fibres noradrénergiques se trouvent principalement dans le cortex superficiel et profond ainsi que

près de la jonction corticomédullaire, où se trouvent les thymocytes les plus matures. Une faible quantité de fibres noradrénergiques est aussi présente dans la medulla. La sympathectomie chimique induit l'atrophie du thymus ainsi que l'apoptose des thymocytes, suggérant que les catécholamines exercent un effet positif sur la viabilité des thymocytes (Tsao et al., 1996).

III-2-c- La rate

La rate est l'organe lymphoïde secondaire le plus volumineux. Elle est constituée de la pulpe blanche, de la pulpe rouge et est délimitée par la capsule splénique. La pulpe rouge sert de filtre pour le sang. La pulpe blanche contient les cellules immunitaires telles que les LT, les LB, les DC et les macrophages. La rate est très innervée par les fibres noradrénergiques (Felten et al., 1987). Les fibres noradrénergiques forment un plexus autour des artères centrales et des branches artériolaires. Elles continuent jusqu'à la pulpe blanche en suivant le trajet de l'artère centrale. Ces fibres sont en contact direct avec les lymphocytes dans la zone marginale et dans le manchon lymphoïde péri-artériolaire. Un traitement à la 6-OHDA diminue le nombre de cellules dans la rate (Rice et al., 2002). La sympathectomie chimique affecte plus particulièrement le nombre de neutrophiles et de macrophages.

III-2-d- Les ganglions lymphatiques

Les ganglions lymphatiques sont répartis en différents endroits du corps. Chaque ganglion est entouré d'une capsule, et est composé d'un cortex (zone de LB), d'un paracortex (zone de LT, de macrophages et de DC) et d'une medulla centrale (zone de plasmocytes et de LB mémoires). Les ganglions assurent une fonction de filtration de la lymphe. Les fibres noradrénergiques entrent dans les ganglions lymphatiques avec le système vasculaire dans la région du hile. Les fibres nerveuses traversent ensuite la medulla pour aller dans le cortex et le paracortex (Felten et al., 1984). Une sympathectomie chimique diminue le nombre de LT $CD4^+$ et $CD8^+$ ainsi que la prolifération des lymphocytes T *ex-vivo* induite par la Con-A. Au contraire, le nombre de LB dans les ganglions augmente ainsi que leur prolifération induite par le LPS *ex-vivo* (Madden et al., 1994). Ainsi, il semble que l'influx nerveux sympathique module le nombre et la prolifération des différentes populations lymphocytaires. Une étude plus récente a démontré, en utilisant notamment la 6-OHDA ou un agoniste des récepteurs

ADRβ2, chez la souris, que la stimulation sympathique retarde la sortie des lymphocytes des ganglions lymphatiques (Nakai et al., 2014).

III-3- Expression des récepteurs aux hormones du stress par les cellules immunitaires

Si toutes les cellules immunitaires possèdent des RG, l'expression des récepteurs adrénergiques varie selon le type de cellule immunitaire. La technique de liaison spécifique (« ligand-binding studies ») a permis de mettre en évidence initialement la présence des récepteurs adrénergiques sur les cellules. Cette technique consiste à marquer des agonistes ou des antagonistes des récepteurs adrénergiques avec un radio-isotope, le plus utilisé est l'iode-125. La fixation de l'agoniste ou de l'antagoniste est analysée ensuite par radioactivité (Molinoff, 1984). Le séquençage des gènes codant les récepteurs adrénergiques humains a permis de développer d'autres techniques pour étudier l'expression des récepteurs adrénergiques sur les cellules telles que la PCR, le Western-Blot et la cytométrie en flux.

Les macrophages murins et humains possèdent les récepteurs ADRα2 et ADRβ2 (Liggett, 1989; Spengler et al., 1990). Des études récentes ont décrit la présence des récepteurs ADRα1 et ADRβ1 sur une lignée cellulaire monocytaire humaine THP-1 (Grisanti et al., 2010, 2011). Les DC murines expriment les récepteurs ADRα1, ADRα2 et ADRβ2 (Maestroni, 2000; Yanagawa et al., 2010), ces mêmes récepteurs sont aussi exprimés sur les cellules NK humaines (Jetschmann et al., 1997). Les neutrophiles humains ne possèdent que le récepteur ADRβ2 (Musgrave and Seifert, 1994; Pohl et al., 1991). Les LT et LB murins et humains expriment fortement le récepteurs ADRβ2 (Pochet et al., 1979; Sanders et al., 1997). Concernant les LT $CD4^+$, le récepteur ADRβ2 est exprimé sur les T naïfs et sur les Th1 mais pas sur les Th2 (Ramer-quinn, 1997). Les LT expriment aussi les récepteurs ADRα1 et ADRα2 (Ricci et al., 1999; Titinchi and Clark, 1984). Les cellules nTreg expriment moins d'ARNm codant le récepteur ADRβ2 par rapport aux cellules T $CD4^+$ naïves (Guereschi et al., 2013). Cependant, le récepteur ADRβ2 est fonctionnel puisque son activation induit une augmentation de la quantité d'AMPc intracellulaire ainsi que la phosphorylation de la protéine CREB. Concernant les LT CD8+, le récepteur ADRβ2 est plus exprimé dans les cellules $CD8^+$ mémoires que dans les cellules naïves (Slota et al., 2015)

III-4- Influence des cytokines sur l'axe HPA

L'influence du système immunitaire sur l'axe HPA a été mise en évidence en 1981 (Besedovsky et al., 1981). Dans ces expériences, des splénocytes de rat et des leucocytes humains ont été traités avec de la Con-A pendant 48h. Après le traitement, les surnageants de culture ont été récupérés puis injectés par voie *ip* à d'autres rats. L'injection de ces surnageants augmente le taux de corticostérone plasmatique par rapport à l'injection de surnageant de cellules non traitées ou de milieu seul. Ainsi, les molécules sécrétées par les cellules traitées à la Con-A affectent les fonctions endocriniennes. Quelques années plus tard, un effet identique a été obtenu avec de l'IL-1β injectée chez des rats (Besedovsky et al., 1986). Le taux de corticostérone augmente suite à l'injection d'IL-1β et cette augmentation n'est pas observée en présence d'un anticorps anti-IL-1β. Par la suite, il a été montré que le TNF-α et l'IL-6 injectés par voie *iv* induisent aussi une augmentation du taux d'ACTH et de corticostérone plasmatiques chez le rat mais de moindre amplitude que celle obtenue avec l'IL-1β. (Besedovsky et al., 1991).

La sécrétion d'ACTH plasmatique induite par l'IL-1β diminue fortement en présence d'anticorps anti-CRH démontrant que la sécrétion d'ACTH induite par l'IL-1β est dépendante de la CRH (Berkenbosch et al., 1987). Des résultats identiques ont été obtenus avec du TNF-α démontrant que la sécrétion d'ACTH et de corticostérone induite par le TNF-α est aussi dépendante de la CRH (Bernardini et al., 1990).

L'injection d'IL-6 chez des souris KO pour le gène codant la CRH ($CRH^{-/-}$) induit une augmentation de la concentration d'ACTH plasmatique (Bethin et al., 2000). Dans cette étude, des marquages d'immunohistochimie en utilisant des anticorps anti-ACTH et anti-IL-6 récepteur ont été réalisés sur des coupes d'hypophyse antérieure. Les récepteurs à l'IL-6 colocalisent avec l'ACTH présents dans les cellules de l'hypophyse antérieure. L'IL-6 est capable de stimuler la production d'ACTH par l'hypophyse antérieure indépendamment de la présence de CRH.

L'injection d'endotoxines, tel que le lipopolysaccharide (LPS), est un modèle utilisé pour mimer une infection à bactérie Gram négative. Lors d'une infection, le LPS déclenche la sécrétion dans le plasma de cytokines, notamment l'IL-1β, l'IL-6 et le TNF-α. Une injection au LPS chez la souris augmente la concentration d'ACTH plasmatique 2h et 4h après l'injection (Perlstein et al., 1993). La concentration d'ACTH revient au niveau basal 6h après l'injection. Le pré-traitement de la souris avec un anticorps anti-IL-6 empêche l'effet du LPS sur la concentration d'ACTH. Un prétraitement simultané avec des anticorps anti-récepteur à

l'IL-1α et anti-TNF-α prévient que partiellement l'effet du LPS. Ces résultats sont observés 2h après l'injection. Quatre heures après l'injection, le pré-traitement avec des anticorps anti-récepteur IL-1α, anti-TNF-α ou anti-IL-6 empêche totalement l'effet du LPS. Ainsi, ces trois cytokines agissent en synergie pour moduler les réponses endocriniennes.

Une question se pose suite à ces différentes observations : Comment les cytokines atteignent-elles le système nerveux central ? En effet, le système nerveux central est protégé par la barrière hémato-encéphalique (BHE) dont l'endothélium possède une faible perméabilité. Les cytokines ne pouvant pas traverser la BHE par diffusion libre, différents modes de diffusion des cytokines ont été décrits. (i) Les cytokines peuvent entrer dans le système nerveux central par l'intermédiaire des organes circumventriculaires qui ne possèdent pas de BHE permettant aux cytokines de diffuser facilement de manière non spécifique (Katsuura et al., 1990). (ii) Les cytokines sont aussi capables de traverser la BHE par diffusion facilitée ou par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique (Banks et al., 1995). La BHE possède des sites de liaison aux cytokines permettant la diffusion des cytokines à travers la BHE. Dans le cas du TNF-α, ce sont les récepteurs aux TNF-α (p75 et p55) présents sur les cellules endothéliales de la BHE qui en assure le transport. Dans le cas de l'IL-1β, le transporteur est distinct du récepteur à l'IL-1. En effet, le blocage du récepteur à l'IL-1 n'empêche pas le transport de l'IL-1β à travers la BHE (Banks and Erickson, 2010). (iii) Une voie nerveuse ascendante a aussi été décrite. Les cytokines, notamment l'IL-1β, sont capables de stimuler le nerf vague, dont les neurones possèdent des récepteurs à l'IL-1β (Goehler et al., 1999). L'information est ensuite intégrée au niveau du noyau du tractus solitaire puis projetée vers le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus.

IV- Les différents effets d'un stress sur l'immunité

Les effets d'un stress sur le fonctionnement des cellules immunitaires sont différents en fonction du tissu concerné ou du type cellulaire impliqué.

Les GC sont utilisés depuis plus de 50 ans pour leurs propriétés anti-inflammatoires dans le traitement des maladies inflammatoires et de certaines maladies auto-immunes (Franchimont, 2004). L'activation de l'axe HPA est généralement décrite comme plutôt immunosuppressive (Elenkov, 2004).

Les catécholamines, l'Ad et la NA, ont des effets différents qui dépendent du récepteur adrénergique ciblé. De plus, l'effet des catécholamines sur l'immunité reste encore largement méconnu.

Pour analyser les effets d'un stress sur l'immunité, deux types d'études peuvent être utilisées (i) l'exposition d'un organisme entier à un agent stressant ou (ii) le traitement des cellules immunitaires avec les hormones du stress (Ad, NA ou GC).

IV-1- Effets sur la concentration de cytokines plasmatiques et tissulaires

Une des conséquences d'une exposition à un ou plusieurs agents stressants est la modulation de la concentration de cytokines plasmatiques et tissulaires.

Chez le rat, des chocs électriques imprévisibles augmentent les niveaux de protéine IL-1β dans l'hypothalamus, l'hypophyse et la rate (O'Connor et al., 2003). L'ajout d'un antagoniste des récepteurs ADRα prévient l'augmentation d'IL-1β plasmatique tandis qu'un antagoniste des récepteurs ADRβ empêche l'augmentation d'IL-1β dans l'hypothalamus, l'hypophyse et l'hippocampe (Johnson et al., 2005). Ainsi, le SAM contrôle la production d'IL-1β lors d'une exposition aigüe à un agent stressant. Des résultats similaires ont été observés chez l'homme. Une méta-analyse a démontré, qu'après un TSST, les niveaux plasmatiques d'IL-6 et d'IL-1β augmentent par rapport aux personnes contrôles (Steptoe et al., 2007).

Dans un modèle de stress chronique léger imprévisible, les sécrétions d'IL-1β et de TNF-α plasmatiques augmentent par rapport aux souris non stressées (Liu et al., 2015). Des résultats similaires sont observés lors d'un conflit social répété (Savignac et al., 2011). Au niveau tissulaire, dans un modèle de stress chronique léger imprévisible, l'expression des ARNm codant l'IL-1β augmente dans le cortex, tandis que l'expression des ARNm codant le

TNF-α augmente dans l'hippocampe, le cortex et la rate et l'expression des ARNm codant l'IL-6 augmente dans l'hypothalamus et la rate. Au contraire, pour les cytokines anti-inflammatoires, l'expression des ARNm codant l'IL-10 diminue dans le cortex et l'expression des ARNm codant le TGF-β diminue dans l'hippocampe et la rate (You et al., 2011). Ainsi, une exposition chronique à un agent stressant entraîne un déséquilibre entre cytokines pro- et anti-inflammatoires en faveur des cytokines pro-inflammatoires. Chez l'homme, une méta-analyse a démontré que les quantités d'IL-6 et de TNF-α plasmatiques étaient augmentées chez les patients diagnostiqués dépressifs par rapport aux personnes contrôles (Dowlati et al., 2010).

Des résultats similaires ont été observés en conditions inflammatoires. Des rats exposés à des chocs électriques puis traités au LPS présentent une quantité de TNF-α et d'IL-1β plus importante par rapport aux rats non stressés traités au LPS. Deux heures après l'injection de LPS, aucune différence n'est plus observée entre les rats stressés et non stressés (Johnson et al., 2002). Lors d'un conflit social répété suivi d'une injection de LPS, l'expression des ARNm codant l'IL-1β et le TNF-α augmente dans le cerveau, le foie, les poumons et la rate par rapport à des souris non stressées (Quan et al., 2001).

De manière générale, un stress aigu ou chronique, en conditions inflammatoires ou non, augmente la quantité de cytokines pro-inflammatoires plasmatique et dans les tissus du système nerveux central. L'augmentation de la quantité de cytokines pro-inflammatoires traduit une activation des cellules immunitaires. Quelques heures après la fin de l'exposition aigüe à un agent stressant, la quantité de cytokines pro-inflammatoires revient au niveau basal. Lors d'une exposition chronique à un agent stressant, la quantité de cytokines pro-inflammatoires reste élevée toute la durée de la situation stressante entrainant une activation continue de l'axe HPA. Les cytokines traversent alors la BHE et agissent sur les tissus du système nerveux central entraînant un « comportement de maladie » (« sickness behaviour ») caractérisée par de la fièvre, de la fatigue, des comportements d'anxiété et de dépression (Dantzer et al., 2008).

IV-2- Effets sur la formule leucocytaire

Une deuxième conséquence d'une exposition au(x) facteur(s) de stress est la modification de formule sanguine.

En 1995, Dhabhar et ses collaborateurs mettent en évidence qu'une immobilisation pendant 2h chez le rat entraîne une diminution du nombre de leucocytes et un changement dans la distribution des leucocytes. En effet, les nombres de lymphocytes, de cellules NK et de monocytes diminuent tandis que le nombre de neutrophiles circulants augmente. Lorsque l'animal n'est plus en condition stressante, les nombres de leucocytes reviennent au niveau basal en quelques heures (Dhabhar et al., 1995).

Au contraire, un conflit social de 24h n'induit pas de modification du nombre de leucocytes circulants. Toutefois, une inversion de formule est observée avec diminution du nombre de lymphocytes (LT $CD4^+$, LT $CD8^+$ et LB) et augmentation du nombre de neutrophiles, de monocytes et de cellules NK (Engler et al., 2004). Un traitement par un antagoniste des récepteurs ADRα prévient la lymphopénie et la neutrophilie. De même, l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs ADRβ prévient l'augmentation des monocytes, des cellules NK et des neutrophiles. Ainsi, les catécholamines jouent un rôle important dans la mobilisation différentielle des leucocytes sanguins en cas de stress chez le rat.

Chez l'homme, quelques minutes après l'atterrissage suite à un saut en parachute, le nombre de lymphocytes circulants augmente puis revient à l'état basal une heure après le saut (Schedlowski et al., 1993). L'ajout d'un antagoniste des récepteurs ADRβ prévient ce phénomène. De façon intéressante, l'augmentation des lymphocytes dans ce contexte n'est pas observée chez des patients ayant subi une splénectomie (Benschop et al., 1996). Ainsi, les lymphocytes seraient principalement recrutés à partir de la rate lors d'un stress.

S'il est difficile de comparer les données obtenues dans différentes études, les types de stress ainsi que les durées étant différents, Dhabhar a établi malgré tout un modèle biphasique de redistribution leucocytaire (Figure 22).

Dans les premières minutes (entre 2 et 30 min) suivant le début de l'exposition à un agent stressant, l'Ad et la NA mobilisent les monocytes, les neutrophiles et les lymphocytes dans le sang à partir des « réservoirs » (« barracks ») tels que la rate, les poumons, la moelle osseuse ou les ganglions lymphoïdes. Plus tardivement (entre 30 min et 2h), le nombre global de monocytes et de lymphocytes diminue, les cellules circulent du sang vers les organes cibles c'est-à-dire : (i) les sites de blessures, d'entrées de pathogènes ou d'inflammation en cours

(« battlefields »), (ii) les sites de surveillance immunitaire c'est-à-dire les organes se trouvant à l'interface entre l'extérieur et l'intérieur de l'organisme (« surveillance tissue-homing ») et (iii) et retournent aux « réservoirs ». Le trafic cellulaire est principalement médié par la corticostérone mais aussi par l'Ad. Cette redistribution leucocytaire est considérée comme une réponse de l'organisme favorisant l'immunité face à un stress aigu.

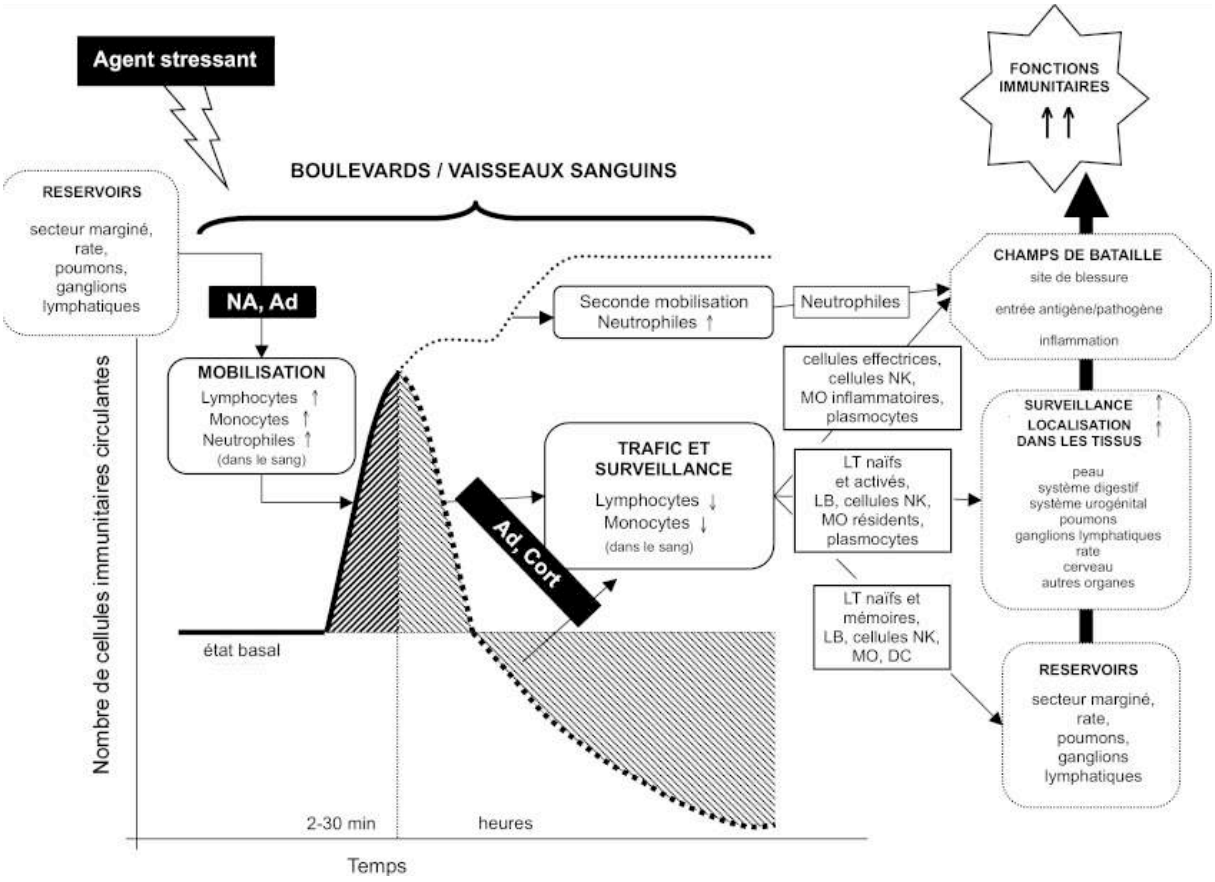


Figure 22- Modèle de la redistribution leucocytaire induite par les hormones du stress (Dhabhar et al., 2012). MO, monocytes ; Ad, adrénaline ; NA, noradrénaline et Cort, cortisol.

La mobilisation leucocytaire a également été analysée dans un modèle d'hypersensibilité retardée. L'hypersensibilité retardée aux haptènes est un modèle d'inflammation cutanée spécifique des antigènes. L'animal est sensibilisé par application cutanée d'une solution de DNFB (dinitrofluorobenzène) sur l'oreille. L'animal est ensuite réexposé au DNFB. Dans un modèle d'hypersensibilité retardée, une immobilisation aigue augmente le redéploiement lymphocytaire en diminuant le nombre de lymphocytes dans le sang et en augmentant le nombre de lymphocytes au niveau de l'oreille où a été appliquée la solution de DNFB ; au contraire, une immobilisation répétée diminue le redéploiement lymphocytaire (Dhabhar and McEwen, 1997). Dans ce modèle, l'effet du stress sur l'expression des molécules impliquées

dans le trafic des LT a été étudié (Viswanathan et al., 2005). Les molécules d'adhésion CD44 et CD162 sont impliquées dans le recrutement des leucocytes dans un tissu inflammé. Les molécules CD28 et CD11a (une des chaines formant l'intégrine LFA-1) sont impliquées dans la synapse immunologique. Le lendemain de la sensibilisation au DNFB, les nombres de LT $CD4^+$ et $CD8^+$ exprimant les molécules CD44, CD162, CD11a ou CD28 (excepté pour les LT $CD8^+$) présents dans les ganglions lymphatiques augmentent chez les souris ayant subi une immobilisation. Une immobilisation permet une activation plus importante des LT dans les ganglions lymphatiques. De plus, une immobilisation induit également une augmentation du nombre de LT $CD4^+$ et $CD8^+$ exprimant le CD162 dans le derme permettant une augmentation de la surveillance dans ce tissu.

Des résultats semblables ont été trouvés chez l'homme. La prise de parole en public, ou la réalisation d'un exercice physique comme faire du vélo, diminue l'expression membranaire des molécules CD62L et augmente l'expression des molécules d'adhésion CD11a et CD54 sur les lymphocytes. L'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion sur les LT suite à un stress aigu permettrait aux cellules T d'arriver rapidement au site inflammatoire (Goebel and Mills, 2000).

Ainsi, l'exposition aigu ou chronique d'un individu à des agents stressants induit une modulation de la sécrétion des cytokines plasmatiques et de la mobilisation leucocytaire. Ces agents modulent aussi spécifiquement les fonctions des différents types de cellules immunitaires.

IV-3- Effets sur les fonctions des cellules de l'immunité innée

IV-3-a- Les neutrophiles

Lors d'un test PASAT (« Paced Auditory Serial Addition Test »), qui consiste à écouter une bande audio sur laquelle une série aléatoire de chiffres est donnée et à additionner les chiffres 2 à 2, la fréquence et la pression cardiaques, la fréquence respiratoire et le taux de cortisol sont augmentés. Chez des personnes dont la moyenne d'âge est de 25 ans, le test PASAT induit une augmentation de la phagocytose de bactéries *E.coli* par les neutrophiles et une diminution de la production de résidus superoxydes en présence de la bactérie *E.coli*

(Khanfer et al., 2010). Chez des personnes avec une moyenne d'âge de 75 ans, seule la diminution de la production de résidus superoxydes est observée (Khanfer et al., 2012).

Toujours chez l'homme, un stress chronique diminue la capacité de phagocytose des neutrophiles. En effet, le nombre de particules phagocytées par les neutrophiles est négativement corrélé avec le score d'évènements stressants. Les neutrophiles phagocytant le moins sont ceux issus de personnes ayant connu de nombreux évènements stressants durant les 18 mois précédents l'étude (Tsukamoto and Machida, 2012). Des résultats similaires ont été trouvés chez le rat. Un stress sonore répété pendant 4 jours consécutifs diminue la production de résidus superoxydes ainsi que la phagocytose. Dans ce modèle, l'ablation de la médullo-surrénale prévient la diminution des fonctions principales des neutrophiles. La diminution de la phagocytose et de la production de ROS chez les neutrophiles induite par un agent stressant sonore serait plutôt médiée par l'Ad (Brown et al., 2008).

L'effet de l'Ad sur des neutrophiles humains traités en présence de LPS a été analysé *in vitro* (Wahle et al., 2005). Lors d'un traitement au LPS, les molécules d'adhésion, comme le CD44 et CD54, ainsi que les chimiokines secrétées par les neutrophiles augmentent ce qui facilite la migration vers le lieu de l'infection. Ces deux molécules d'adhésion sont aussi impliquées dans d'autres fonctions : le CD54 dans la production de résidus superoxydes et le CD44 dans les phénomènes de phagocytose (Moffat et al., 1996; Takashi et al., 2001). En présence d'Ad, l'augmentation d'expression de CD54 LPS-médiée est inhibée. Au contraire, l'Ad potentialise l'effet du LPS sur l'expression de CD44.

La NA module aussi la phagocytose par des neutrophiles murins issus d'une blessure. Ainsi, la capacité de phagocytose des neutrophiles est diminuée par un traitement à la NA. Cet effet n'est pas observé avec un antagoniste des récepteurs ADRβ ou d'un inhibiteur de la PKA, suggérant un effet médié par les récepteurs ADRβ couplés aux protéines Gαs (Gosain et al., 2009).

Tandis que la modulation de la capacité de phagocytose des neutrophiles par un stress aigu ou chronique est plutôt médiée par les catécholamines, les GC ont plutôt un effet sur la production de résidus superoxydes. En effet, un traitement à l'hydrocortisone diminue la quantité d'ARNm codant la sous-unité $p47^{PHOX}$ de la NAPDH oxydase dans les neutrophiles humains 2h après le début du traitement (Ignacchiti et al., 2011).

IV-3-b- Les macrophages

Une courte immobilisation diminue la capacité de phagocytose des macrophages alvéolaires du rat (Leandro et al., 2007). De même, un choc électrique imprévisible ou la vision d'une souris subissant un choc électrique diminue la phagocytose des macrophages péritonéaux et augmente leur production de réactifs oxygénés (Palermo-Neto et al., 2003). Les sécrétions de TNF-α et d'IL-1β induites par le LPS augmentent lorsque les macrophages alvéolaires sont issus d'une souris ayant subi un choc électrique tandis que la production de monoxyde d'azote est fortement diminuée (Persoons et al., 1995).

Un stress chronique (exposition au froid quelques heures pendant plusieurs jours) induit une diminution de la capacité de phagocytose des macrophages péritonéaux recrutés par le LPS, une diminution de la sécrétion de TNF-α et d'IL-6 et une augmentation de la sécrétion d'IL-10 suggérant que les macrophages ont un phénotype plutôt anti-inflammatoire. Dans ces expériences, il est également observé une diminution d'expression des molécules du CMH de classe II ainsi que du CD80, suggérant une baisse de la capacité des macrophages à présenter un antigène. L'expression des ARNm codant les GR diminue tandis que les ARNm codant les récepteurs ADRβ2 augmente. Ainsi, ces effets seraient plutôt médiés par les récepteurs ADRβ2 (Sesti-Costa et al., 2012).

Lors d'un stress aigu ou chronique, la capacité de phagocytose des macrophages diminue. La modulation des sécrétions de cytokines par les macrophages diffère suivant la durée de l'exposition à l'agent stressant. Une exposition courte augmente la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induites par le LPS alors qu'une exposition prolongée la diminue. Ces effets semblent principalement médiés par les catécholamines.

IV-3-c- Les cellules NK

Chez l'homme, un stress aigu, comme un saut à l'élastique ou un test mental d'arithmétique, augmentent le nombre de cellules NK circulantes ainsi que leur activité cytotoxique (Schedlowski et al., 1993; Delahanty et al., 2000).

Chez la souris, un stress chronique léger imprévisible diminue la cytotoxicité des cellules NK (Kubera et al., 1998). Des résultats similaires ont été observés chez l'homme, les cellules NK de personnes dépressives (conséquence d'une exposition chronique à un ou plusieurs

agents stressants) ont une cytotoxicité plus faible que des personnes non dépressives (Pike and Irwin, 2006).

De nombreuses études ont démontré le rôle des catecholamines dans la modulation des fonctions des cellules NK lors d'un stress. Chez le rat, une exposition au froid pendant 4h diminue la cytotoxicité des cellules NK spléniques. Cette diminution de la cytotoxicité n'est pas observée lorsque les rats ont été traités avec de la 6-OHDA ou avec un antagoniste des récepteurs ADRβ. La diminution de la cytotoxicité des cellules NK est médiée par l'activation du récepteur ADRβ (Jiang et al., 2004). Des résultats similaires ont été observés chez la souris, lors d'un protocole de privation de sommeil pendant 48h, en présence d'un β-bloquant, le propranolol (De Lorenzo et al., 2015).

In vitro, un traitement à la NA pendant 18h diminue l'activité cytotoxique des cellules NK spléniques de rats (Dokur et al., 2004). Cette diminution est accompagnée d'une diminution des ARNm codant le granzyme B, la perforine et l'IFN-γ, associés à l'activité cytototoxique. Les mêmes résultats sont obtenus avec un β2-agoniste. Ainsi, la diminution des fonctions des cellules NK par les agents stressants semble au moins en partie médiée spécifiquement par le récepteur ADRβ2 (De Lorenzo et al., 2015).

Néanmoins, les GC contribuent également à la modulation des fonctions des cellules NK. Le traitement à la dexaméthasone des cellules de la lignée humaine NK92 pendant 24h diminue l'activité lytique, les sécrétions de cytokines (IFN-γ et IL-6), de perforine et de granzyme B et l'expression de LFA-1. De plus, la dexaméthasone réduit l'acétylation de la lysine en position 8 sur l'histone 4 (H4-K8) et diminue l'accessibilité aux promoteurs des gènes codant la perforine, l'IFN-γ et le granzyme B. La modulation de la fonction des cellules NK par les GC est donc en partie contrôlée par des facteurs épigénétiques (Krukowski et al., 2011). Ainsi, un stress aigu ou chronique module les fonctions des cellules NK.

IV-4- Effets sur les fonctions des cellules dendritiques

L'effet d'un stress sociale chronique a été analysé sur des DC spléniques murines. Trois souris sont exposées à un mâle agressif 2h par jour pendant 6 jours consécutifs (Powell et al., 2009). Les DC spléniques $CD11c^+$ issues de souris ayant subi un conflit social présentent une augmentation d'expression des molécules du CMH de classe I, de CD80 et de CD44. *In vitro*, après stimulation par le LPS, les cellules $CD11c^+$ spléniques isolées à partir de souris stressées sécrètent plus de TNF-α, d'IL-6 et d'IL-10 par rapport à des souris contrôles.

Dans un modèle d'hypersensibilité retardée, après injection de DC couplées au DNBS (« dinitrobenzene sulfonic acid ») par voie sous-cutanée, leur nombre augmente dans les ganglions lymphatiques lorsque l'injection est suivie d'une immobilisation (Saint-Mezard et al., 2003). Dans ce modèle, le stress aigu induit également une prolifération accrue des LT $CD8^+IFN\text{-}\gamma^+$ spécifiques de l'haptène. La sympathectomie chimique prévient la mobilisation des DC vers les organes lymphoïdes secondaires suggérant que la NA exercent un effet adjuvant sur les DC.

Néanmoins, dans un modèle d'infection virale, il a été montré que les réponses $CD8^+IFN\text{-}\gamma^+$ spécifiques du virus de la grippe étaient plus importantes chez les souris traitées à la 6-OHDA ou avec un antagoniste des récepteurs ADRβ2 que chez les souris contrôles (Grebe et al., 2009). Dans ce modèle, la NA par l'intermédiaire du récepteur ADRβ2 diminuerait les réponses $CD8^+$ spécifiques d'un antigène viral.

Ces résultats sont en accord avec les données de notre équipe. Le salbutamol, un agoniste spécifique des récepteurs ADRβ2, inhibe la maturation des DC induite par le LPS ainsi que leur capacité à cross-présenter les antigènes et à activer les cellules T $CD8^+$ spécifiques, de manière Gαi/o- et NF-κB-dépendante (Hervé et al., 2013).

La stimulation des récepteurs adrénergiques module également l'activation des LT $CD4^+$ induite par les DC.

La stimulation de DC murines par un agoniste des récepteurs ADRβ2 diminue leur production d'IL-12 induite par le LPS entraînant une diminution de la différenciation des LT $CD4^+$ naïfs en cellules Th1 (Panina-Bordignon et al., 1997). De plus, le transfert de DC prétraitées à la NA entraîne une augmentation de la sécrétion d'IL-4 et une diminution de la sécrétion d'IFN-γ par les cellules isolées à partir de ganglions lymphoïdes (Maestroni, 2002) : ainsi, la NA diminuerait la différenciation des cellules T naïves en cellules Th1.

Toutefois, des études plus récentes ont mis en évidence l'induction d'autres types de polarisation des LT $CD4^+$ par les DC traitées avec des agonistes adrénergiques. D'après Kim et Jones (2010), un prétraitement à l'Ad de DC murines augmente les sécrétions d'IL12p35 et d'IL-23p19 induites par le LPS. Lorsque ces DC prétraitées à l'Ad puis au LPS sont mises en culture avec des cellules $CD4^+$ activés avec un anticorps anti-CD3, les sécrétions d'IL-17A et d'IL-4 sont augmentées. L'augmentation d'IL-4 contribuerait à une différenciation des cellules T naïves en cellules Th2 tandis que l'augmentation de la sécrétion d'IL-17A favoriserait l'induction de cellules Th17 (Kim and Jones, 2010). Ces données sont en accord avec celles de Manni *et al* qui montre l'induction d'une réponse plutôt Th17 en présence d'un

agoniste des ADRβ2 (Manni et al., 2011). Au contraire, dans un modèle spécifique d'antigène comme les cellules T CD4+ issues de souris OT-II possédant un TCR spécifique d'un peptide dérivé de l'ovalbumine, un prétraitement à l'Ad ou avec un agoniste des récepteurs ADRβ2 faciliterait la différenciation des cellules T naïves en Th2 et en Treg (Nijhuis et al., 2014). Plus récemment, dans un modèle de vaccination chez la souris, nous avons montré que le traitement au salbutamol augmenterait la sécrétion d'IL-10 potentiellement par des cellules T régulatrices de type Tr1 (Hervé, en révision).

IV-5- Effets sur les fonctions lymphocytaires

IV-5-a- Les lymphocytes B

Une immobilisation pendant 2h sur 2 jours consécutifs suivie d'une injection de globules rouges de mouton chez le rat augmente la quantité d'anticorps anti-globules rouge de mouton alors qu'une immobilisation pendant 6h sur 4 jours consécutifs ne modifie pas la quantité d'anticorps anti-globules rouges de mouton par rapport aux rats non stressés (Millán et al., 1996).

Une étude a comparé l'effet d'une immobilisation pendant 2h et d'un stress chronique léger imprévisible sur les deux types d'activation des LB. Les souris ont été immunisées avec des hématies de moutons (activation thymo-dépendante) ou avec du LPS (activation thymo-indépendante). Lors d'une immobilisation aigüe, la quantité d'IgG anti-hématies de mouton augmente alors que dans un modèle de stress chronique léger imprévisible, la quantité d'IgG diminue. Aucun effet des différents agents stressants n'est observé sur la production d'IgM ni sur la production d'immunoglobulines anti-LPS (Silberman et al., 2003). Des résultats similaires ont été observés chez l'homme. Les tests psychologiques, le TSST ou le PASAT, augmentent la quantité d'anticorps spécifiques d'une souche virale suite à une vaccination contre la grippe chez les femmes (Edwards et al., 2006). Une personne s'occupant d'un(e) conjoint(e) malade (stress chronique) possède un taux d'IgG moins élevé 3 à 6 mois après une vaccination contre le pneumocoque par rapport à une personne contrôle (Glaser et al., 2000). Les stress aigu ou chronique agissent majoritairement sur l'activation des LB thymo-dépendante.

Des études ont analysé plus particulièrement l'effet des catécholamines, notamment de la NA, sur les LB. Une étude a notamment démontré l'implication du récepteur ADRβ2 dans la

production d'IgE, jouant un rôle central dans l'asthme. *In vitro*, des LB activés avec du CD40 et de l'IL-4, signaux pour induire spécifiquement la production d'IgE, et traités avec de la NA produisent plus d'IgE que des LB activés non traités (Pongratz et al., 2006). La production d'IgE induite par la NA n'est pas observée avec un antagoniste des récepteurs ADRβ2 ainsi qu'un inhibiteur de la phosphorylation de la p38 (MAPK).

Par ailleurs, la présence d'un agoniste des récepteurs ADRβ2 dans une culture de LB augmente l'expression de la molécule de co-stimulation CD86 induite par la stimulation du BCR (Kohm et al., 2002). Des inhibiteurs de la PKC, la PKA et la MAPK préviennent cet effet. *In vivo*, dans un modèle d'immunisation avec du TNP (trinitophényl) dans des souris scid reconstituées, l'expression du CD86 par les LB $B220^+$ spléniques est plus faible chez les souris ayant subi une sympathectomie par rapport aux souris contrôles. La NA stimule l'expression du CD86 sur les LB.

IV-5-b- Les lymphocytes T

Si de nombreuses études ont analysé les effets d'un agent stressant sur les LT *via* l'activation d'une CPA, d'autres études ont analysé l'effet d'un traitement aux catécholamines directement sur les cellules T.

La présence de NA dans une culture de LT $CD8^+$ humains issus de PBMC en présence d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 diminue le pourcentage de cellules $CD8^+$ exprimant CD25 et CD45RO, marqueurs classiques d'activation (Strell et al., 2009). La présence de NA dans une culture de cellules $CD8^+$ diminue également leur capacité de migration spontanée *in vitro*. Estrada a montré qu'un traitement à la NA diminue les sécrétions d'IFN-γ et de TNF-α par les LT $CD8^+$ ainsi que leur activité lytique. Ces diminutions ne sont pas observée avec un antagoniste des ADRβ2 et indépendantes de la protéine PKA (Estrada et al., 2016). L'activation du récepteur ADRβ2 par la NA diminue donc de manière directe l'activation des LT $CD8^+$, probablement par l'intermédiaire de la protéine Gαi/o.

Le traitement à la NA de cellules $CD8^+$ mémoires activés par du CD3 et du CD28 augmente l'expression des ARNm codant l'IL-1A, l'IL-6 et le TNF-α mais diminue l'expression des ARNm codant l'IL-2. Ces effets sont prévenus par un antagoniste des récepteurs ADRβ2. (Slota et al., 2015). Contrairement aux LT $CD8^+$ naïfs ($CD45RA^+$), la NA

stimule la production de cytokines pro-inflammatoires par les LT $CD8^+$ mémoires ($CD45RA^-$).

Le traitement de PBMC humains à l'aide d'un agoniste des récepteurs ADRβ2, en présence de Con-A, inhibe les sécrétions d'IFN-γ, de GM-CSF et d'IL-3 par les LT $CD4^+$ (Borger et al., 1998). La présence de NA ou d'un agoniste des récepteurs ADRβ2 dans une culture de LT $CD4^+$ naïfs murins ($CD4^+CD62L^+$) spléniques, et activés avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28, diminue leur sécrétion d'IL-2 (Ramer-Quinn et al., 2000). Lorsque ces cellules sont différenciées en cellules Th1 avec de l'IL-2 et de l'IL-12 ou en cellules Th2 avec de l'IL-4 et de l'IL-5, le traitement à la NA n'affecte pas la sécrétion de cytokines par ces deux types de LT $CD4^+$. Cependant, lorsque la NA est ajoutée au cours de la différenciation des LT $CD4^+$, la sécrétion d'IFN-γ par les cellules Th1 augmente. Cette augmentation d'IFN-γ n'est pas observée avec l'ajout d'un antagoniste des ADRβ2 (Swanson et al., 2001).

Une étude a analysé l'effet d'une activation du ADRβ2 sur les nTreg isolés à partir de souris Foxp3-GFP (Guereschi et al., 2013). Un agoniste des récepteurs ADRβ2 diminue la prolifération des nTreg activés avec un anticorps anti-CD3 ainsi que leur sécrétion d'IL-2. D plus, le traitement des cellules nTreg avec un agoniste des ADRβ2 augmente l'expression du CTLA-4 et augmente la différenciation des LT $CD4^+$ naïfs en iTreg de manière PKA dépendante.

Ainsi, l'activation du récepteur ADRβ2 par de la NA diminue la prolifération des cellules $CD4^+$ (Th1, Th2 et nTreg) et augmente la différenciation des cellules T $CD4^+$ naïves en iTreg qui ont une fonction suppressive médiée par le CTLA-4.

IV-6- Quelques exemples des effets des agents stressants sur les maladies

La modulation du système immunitaire par les hormones du stress peut avoir des conséquences positives ou négatives sur certaines maladies.

IV-6-a- Les maladies auto-immunes

Parmi les facteurs environnementaux, les agents stressants influencent la survenue ou la progression des maladies auto-immunes. Les maladies auto-immunes comme le diabète de

type I, la sclérose en plaque ou la polyarthrite rhumatoïde, sont notamment caractérisées par un déséquilibre de la balance Th1/Th2 en faveur des réponses Th1 avec une production excessive de TNF-α et une moindre production d'IL-10.

Le diabète de type I est une maladie progressive auto-immune touchant les cellules β (cellules insulino-sécrétrices) du pancréas. Cette maladie est caractérisée par l'infiltration des îlots de Langerhans par des LT $CD4^+$ et $CD8^+$ conduisant à la destruction des cellules β. Au cours de la maladie, des auto-anticorps dirigés contre les antigènes pancréatiques sont produits. La souris NOD (« Non-Obese Diabetic ») développe un diabète de type 1 spontané (Kachapati et al., 2012). Chez la souris NOD, une immobilisation chronique (une fois par semaine) ou un surpeuplement protège les femelles de la survenue du diabète de type I. Par contre, une adrénalectomie produit l'effet inverse en augmentant l'incidence de la maladie (Durant et al., 1993). Des injections répétées de solution saline ou une combinaison de différents agents stressants comme le surpeuplement, l'immobilisation, l'exposition au froid et l'anesthésie protègent également la souris NOD du diabète. Ces résultats confirment l'effet protecteur d'un agent stressant considéré comme chronique (Saravia-Fernandez et al., 1996).

La sclérose en plaque est une maladie inflammatoire chronique qui affecte le système nerveux central et résulte d'une démyélinisation focale dans le cerveau et la moelle épinière. (Lassmann and Ransohoff, 2004). Le modèle d'encéphalomyélite auto-immun expérimentale (EAE) est le modèle murin de la maladie le plus fréquemment utilisé. Il consiste à injecter chez la souris la protéine basique de la myéline (MBP) ou une glycoprotéine des oligodendrocytes et de la myéline (MOG) en présence d'adjuvant complet de Freund (CFA). Le stade d'évolution de la maladie est déterminé par une évaluation clinique consistant à graduer de 0 à 5 l'état de paralysie de la souris. Une immobilisation quotidienne d'une heure pendant 5 jours avant l'induction de l'EAE ne modifie pas les signes cliniques de la maladie par rapport à des souris contrôles. Au contraire, une immobilisation quotidienne de 9h sur la même période diminue les signes cliniques de la maladie (Griffin et al., 1993). La protection contre l'EAE par une immobilisation n'est pas empêchée par un antagoniste des ADRβ (Dowdell et al., 1999).

La polyarthrite rhumatoïde est caractérisée par une forte inflammation chronique des articulations synoviales. Cette inflammation liée à une forte sécrétion de TNF-α, d'IL-1β et d'IL-6 est induite par la présence excessive de cellules Th1. Le modèle d'arthrite chronique induite par un adjuvant est un modèle utilisé chez la souris (Chillingworth and Donaldson, 2003). Ce modèle consiste à injecter du CFA par voie sous cutanée au niveau des articulations tibio-tarsiennes. La réaction inflammatoire se met en place 24h après l'injection. Une

adrénalectomie dans le modèle d'arthrite chronique induite par le CFA accélère l'apparition de la maladie et augmente sa sévérité (Harbuz et al., 1993). Au contraire, un traitement avec un agoniste du ADRβ2 diminue la présence des cellules Th1 dans les cavités synoviales et atténue les signes cliniques de la maladie (Malfait et al., 1999). Ainsi, les agonistes des ADRβ2 ont un effet thérapeutique sur la polyarthrite rhumatoïde chez la souris. Chez l'homme, des différences sont observées suivant la sévérité de l'agent stressant. Un stress mineur augmente la gravité de la maladie en augmentant l'érosion des os alors qu'un stress majeur peut atténuer la maladie (Herrmann et al., 2000). Les GC sont utilisés depuis de nombreuses années dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (Baschant et al., 2011).

IV-6-b- Le cancer

Les effets d'un agent stressant ont aussi été analysés dans la progression des tumeurs. Par exemple, une immobilisation quotidienne pendant 14 jours augmente le développement de cellules cancéreuses (Thaker et al., 2006). Dans cette étude, les cellules HeyA8 (lignée cellulaire d'un carcinome ovarien humain) ont été injectées par voie *ip* chez la souris, 7 jours après le début du protocole d'immobilisation. La taille de la tumeur primitive, la densité des vaisseaux et l'expression de VEGF (impliqué dans la néo-angiogenèse) augmentent chez les souris subissant un stress chronique. L'effet pro-tumoral du stress chronique est empêché par un antagoniste ADRβ. L'implication de l'influx nerveux sympathique dans la progression des tumeurs a également été démontrée dans un modèle de cancer de la prostate *in situ* chez la souris (Magnon et al., 2013). Dans ce modèle, les tumeurs sont très innervées par des fibres noradrénergiques. Une sympathectomie chimique à la 6-OHDA prévient le développement du cancer de la prostate. Des résultats similaires ont été obtenus avec des souris knock-out pour les gènes codant les ADRβ2 et ADRβ3. Une autre étude a aussi démontré l'implication du ADRα2. L'effet d'une immobilisation a été analysé dans un modèle de cancer du sein. Des cellules MDA-MB-231 (lignée cellulaire d'un adénocarcinome mammaire humain) ont été injectées dans le tissu adipeux mammaire de souris. Suite à une immobilisation répétée, la taille des tumeurs primitives et des métastases à distance augmente. Cet effet est prévenu par un antagoniste ADRα2 mais pas par un antagoniste ADRβ2 (Lamkin et al., 2015). Ainsi, la stimulation sympathique augmente la survie des cellules cancéreuses, cependant, le type de récepteur adrénergique impliqué dans cette survie diffère suivant la nature de la tumeur.

Enfin, de façon intéressante, une étude épidémiologique chez l'homme a démontré que l'accumulation d'évènements stressants psychologiques (comme par exemple un divorce ou la

mort d'un(e) conjoint(e)) augmente le risque de développement d'un cancer du sein (Lillberg et al., 2003).

Les systèmes neuroendocrinien et immunitaire communiquent de manière bidirectionnelle. En effet, les organes lymphoïdes primaires et secondaires sont vascularisés et innervés par des fibres noradrénergiques et sont soumis aux décharges d'hormones du stress. Les cellules immunitaires expriment les récepteurs à ces hormones et les cytokines qu'elles sécrètent, notamment le TNF-α, l'IL-1β et l'IL-6 peuvent activer l'axe HPA.

Suivant le type ou la nature d'un stress, le type cellulaire, l'environnement des cellules et la localisation des cellules affectées, les conséquences d'une exposition à un agent stressant ne seront pas les mêmes.

Dans la littérature, les stress sont principalement distingués selon leur durée (aigue ou chronique). Globalement, un stress aigu améliore les réponses immuno-protectrices suite à une vaccination, une blessure ou une infection. Cependant, un stress aigu peut exacerber les désordres auto-immuns. Au contraire, un stress chronique induit plutôt une suppression des réponses immunitaires pouvant diminuer l'efficacité d'un vaccin ou d'une cicatrisation et diminuer la résistance aux infections. Un stress chronique augmente les réponses de type Th2 en augmentant la différenciation des LT $CD4^+$ en cellules Th2.

Actuellement, les modèles rongeurs sont les plus utilisés pour comprendre les mécanismes physiologiques et biologiques des différentes maladies. Cependant, l'extrapolation des résultats obtenus avec les rongeurs chez l'humain est souvent difficile. Le porc est un animal très proche de l'homme partageant nombre de caractéristiques anatomiques et physiologiques, justifiant son utilisation à des fins de recherche translationnelle.

V- De l'intérêt du modèle porcin en neuroimmunologie

V-1- Le porc comme modèle pour l'homme

Un consortium a publié en 2012 la séquence complète du génome porcin (Groenen et al., 2012). Celui-ci est composé de 18 autosomes et de 2 gonosomes. La taille du génome d'un porc domestique est estimée à 2800 Mb, une taille comparable à celle du génome humain. De plus, il existe de fortes homologies entre les génomes porcin et humain.

Au niveau anatomique, le porc est comparable à l'homme par rapport à sa taille, son développement d'organes ainsi que la progression des maladies. Deux types de porcs sont utilisés pour la recherche : les porcs de ferme et les porcs miniatures. La différence majeure entre ces deux catégories est le poids à l'âge adulte. Alors qu'un porc de ferme adulte pèsera plus de 100 kg à 4 mois, un porc miniature pèsera au même âge entre 10 et 20 kg suivant la race. Afin d'illustrer l'intérêt du porc comme modèle de maladies humaines, figurent ci-dessous une liste non exhaustive d'exemples de son utilisation en recherche.

Depuis plusieurs décennies, le porc est utilisé comme modèle pour la chirurgie et les maladies cardio-vasculaires humaines ; le porc est notamment utilisé comme modèle d'ischémie cardiaque (Suzuki et al., 2010). Les techniques d'imagerie par résonnance magnétique cardiaque et d'électrocardiogramme utilisées chez l'homme sont applicables chez le porc ce qui facilite l'exploration de la fonction cardiaque. La thérapie cellulaire constitue une stratégie thérapeutique potentielle des maladies cardio-vasculaires ayant pour but de régénérer et revasculariser le myocarde ainsi que de rétablir la contractilité des cardiomyocytes. Une méta-analyse a démontré que le porc était un modèle valide pour prédire les effets d'une thérapie cellulaire avec des cellules souches cardiaques (van der Spoel et al., 2011).

Le porc est également utilisé comme modèle de la mucoviscidose, une maladie génétique causée par une mutation du gène *CFTR* (« Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator »). Cette maladie touche principalement les voies respiratoires mais aussi les voies digestives. Le modèle développé chez la souris ne présente pas les désordres pancréatiques ni intestinaux retrouvés chez l'homme. En 2008, une équipe a développé un modèle de mucoviscidose chez le porc nouveau-né par invalidation du gène *CFTR* (Rogers et al., 2008). Parmi les descendants d'un couple de porc hétérozygotes ($CFTR^{+/-}$), seuls les petits $CFTR^{-/-}$

développent des obstructions intestinales, une insuffisance pancréatique, des lésions hépatiques ainsi que des calculs biliaires. En revanche, leurs poumons fonctionnent normalement. C'est pourquoi un autre modèle porcin a été développé. Il s'agit d'un porc homozygote pour la mutation ΔF508 du gène *CFTR,* mutation la plus fréquemment retrouvée chez l'homme (Ostedgaard et al., 2011). Les porcelets $CFTR^{\Delta F508/\Delta F508}$ présentent les mêmes désordres que les porcelets $CFTR^{-/-}$ mais développent en plus les symptômes respiratoires présents chez l'homme.

La peau du porc est très proche anatomiquement et physiologiquement de celle de l'homme. Le porc et l'homme possèdent une épaisseur de derme et d'épiderme et une organisation vasculaire similaires (Seaton et al., 2015). La ré-épithélialisation est le principal mécanisme de cicatrisation utilisé chez le porc et l'homme, permettant d'utiliser le porc comme modèle humain des mécanismes de cicatrisation et de brûlures.

La xénotransplantation consiste à utiliser le porc comme source d'organes, de tissus ou de cellules et constitue une alternative à la pénurie de dons d'organes. Si les valves aortiques porcines sont déjà utilisées avec succès pour remplacer les valves aortiques humaines défaillantes (Lehmann et al., 2007), les stratégies actuelles de transfert de cellules porcines se heurtent à de nombreuses limitations, la principale étant le rejet hyper aigu lié à la présence de xénoantigènes tels que le galactose-α-1,3-galactose chez le porc (Lutz et al., 2013). Suite à l'identification d'un deuxième xénoantigène, l'acide N-glycolylneuramique, des porcs double KO ont été produits et pourraient constituer une source valable de cellules porcines (Mosser, en révision). Concernant les risques sanitaires de la xénotransplantation, le risque majeur est la contamination par des rétrovirus endogènes porcins (PERV) (Denner, 2008). Une étude récente a montré que des personnes greffées avec des îlots pancréatiques porcins encapsulés ne présentaient pas d'infections aux PERV (Morozov et al., 2017).

V-2- Le stress chez le porc domestique

Le porc est un animal social exposé tout au long de sa vie à des évènements stressants induisant des réponses neuroendocriniennes et comportementales pour faire face à la menace perçue et rétablir l'homéostasie (Martínez-Miró et al., 2016).

Parmi les agents stressants auxquels le porc domestique est sensible, on distingue : l'isolement social, le mélange avec des congénères non familiers, le surpeuplement, la manipulation par l'homme, les changements de température de loge ou le transport.

V-2-a- Les indicateurs des réponses neuroendocriniennes

- Les indicateurs physiologiques

Chez le porc comme chez l'homme, lors d'une exposition à un agent stressant, les axes HPA et SAM sont activés. Comme décrit précédemment, l'activation de l'axe HPA permet la libération de cortisol et l'activation de l'axe SAM permet la libération de catécholamines (Ad et NA). La technique de prélèvement la plus utilisée pour analyser les niveaux d'hormones du stress est le prélèvement sanguin. Les concentrations d'hormones du stress sont ensuite obtenues par différentes méthodes de dosage. De nouvelles méthodes de prélèvement non invasif sont développées. Une première méthode alternative a été développée : le prélèvement des urines (Hay and Mormède, 1997). En effet, l'urine est la principale voie d'élimination des hormones du stress et son prélèvement est non invasif pour l'animal. La détection de biomarqueurs salivaires du stress constitue une autre alternative. Comme l'urine, le prélèvement de salive est non invasif et les procédures de prélèvements sont simples.

L'activation de l'axe HPA par un agent stressant stimule la sécrétion de cortisol salivaire (Cook et al., 1996). Il existe une corrélation entre le taux de cortisol plasmatique et le taux de cortisol salivaire suite à une stimulation à l'ACTH ou à une immobilisation chez le porc. Des résultats similaires ont été obtenus chez la cochette (Merlot et al., 2011). Dans cette étude, les cochettes ont été exposées à 12 stress aigu différents sur une période de 18 jours. Un bruit intense, des chocs électriques, un tatouage de l'oreille, une biopsie, un prélèvement sanguin, une immobilisation et un changement de loge augmente la concentration d'ACTH plasmatique et de cortisol plasmatique et salivaire. De plus, la concentration de cortisol plasmatique est corrélée positivement avec la concentration de cortisol salivaire. Le cortisol salivaire pourrait être utilisé comme biomarqueur de l'activation de l'axe HPA suite à un stress.

Concernant l'activation de l'axe SAM, l'Ad et la NA étant présentes en faible quantité dans la salive, la quantification de l'α-amylase ou de la chromogranine-A est utilisée comme alternative au dosage des catécholamines.

L'α-amylase est une enzyme produite par les glandes salivaires et augmente lors d'un stress physique ou psychologique (Granger et al., 2007). Chez l'homme, en réponse à un agent stressant, l'augmentation de l'α-amylase est corrélée à l'augmentation de la NA. Chez le porc, un stress d'immobilisation induit également une augmentation de l'activité de l'α-amylase salivaire (Fuentes et al., 2011).

La chromogranine-A est une protéine présente dans les granules des cellules chromaffines et est aussi stockée dans les glandes salivaires. La libération de chromogranine-A est médiée par la sécrétion de catécholamines (Tony, 2003). Chez le porc, la concentration de chromogranine-A salivaire augmente suite à un stress aigu comme l'immobilisation (Escribano et al., 2013).

Associés aux réponses neuroendocriniennes, le porc adopte différents comportements caractéristiques face à un agent stressant.

- Les indicateurs comportementaux

Les études sur le stress porcin intègrent le plus souvent des analyses comportementales.

L'augmentation des vocalisations est considérée comme un comportement associé au stress. L'injection de CRH par voie *intracerebroventriculaire* (*icv*) augmente la concentration d'ACTH et de cortisol plasmatique ainsi que l'intensité des vocalisations chez le porc (Johnson et al., 1994). La castration chez le porcelet induit également des vocalisations (White et al., 1995). Les cris émis par les porcelets castrés sans anesthésie sont plus intenses que ceux émis par des porcelets castrés anesthésiés et leur fréquence cardiaque est également plus importante. Une étude a démontré la corrélation entre l'augmentation de la fréquence des cris aigus et l'augmentation de la concentration d'Ad circulante (Schrader and Todt, 1998).

D'autres comportements spécifiques du stress existent (Reimert et al., 2013). Par exemple, un stress d'immobilisation chez le porc augmente les tentatives d'échappement, la défécation, l'envie d'uriner ou au contraire la prostration.

V-2-b- Les facteurs influençant les réponses au stress chez le porc

Certains facteurs influencent les réponses au stress chez le porc comme le statut social et la réactivité comportementale (« coping style »).

- Le statut social

Le porc vit en groupe avec une structure hiérarchique comprenant des dominants et des dominés. La formation d'un nouveau groupe social dans un espace restreint augmente le comportement agressif des animaux jusqu'à l'établissement de la nouvelle hiérarchie sociale (McGlone, 1985). Les attaques des dominants sont caractérisées par des morsures et des coups donnés principalement au niveau des oreilles et du cou des individus soumis.

Un moyen de déterminer le statut social d'un porc est donc de le mettre en présence d'un porc non familier (Fernandez et al., 1994). La concentration en cortisol plasmatique augmente chez les deux types d'individus pendant la rencontre. Trente minutes après la rencontre, alors que le taux de cortisol de l'animal dominant est revenu au niveau basal, celui du porc dominé reste élevé. Les taux d'Ad et de NA augmentent aussi pendant la rencontre mais aucune différence n'est observée entre dominant et dominé. Une expérience similaire a été réalisée avec des cochettes (Ruis et al., 2001). Une cochette ayant subi une défaite possède des taux d'ACTH, de cortisol plasmatique et salivaire, d'Ad et de NA plus élevés qu'une cochette ayant gagné le combat.

Les réponses neuroendocriniennes sont différentes lorsqu'un dominant ou un dominé est introduit dans un groupe social déjà établi. Le test de compétition pour la nourriture, qui consiste à ajouter la nourriture après une privation de 12h, permet d'analyser les comportements agonistiques des porcs dans un nouveau groupe. Les porcs dominants sont ensuite mélangés avec des congénères non familiers induisant une augmentation de leurs taux de cortisol et de catécholamines plasmatiques. Dans cette étude, seule la concentration de NA plasmatique apparaît plus élevée chez les porcs dominants (de Groot et al., 2001).

Ainsi, le statut social influence les concentrations plasmatiques des hormones du stress.

- La réactivité comportementale (concept de « coping style »)

Les mécanismes d'adaptabilité ont été beaucoup étudiés chez les rongeurs et deux types extrêmes ont été décrits : le comportement proactif et réactif (Koolhaas et al., 1999). Chez le porc, une classification similaire a été proposée, reposant sur le comptage du nombre de tentatives de redressement au cours d'une immobilisation sur le dos pendant une minute (« backtest »). Les porcelets ayant tenté de se redresser plus de deux fois sont considérés comme des porcs résistants par opposition aux porcs non-résistants.

Hessing *et al.* ont démontré une forte corrélation positive entre l'agressivité des porcelets à l'âge de une semaine et leur résistance (Hessing et al., 1994). Placés dans un nouvel environnement (test « open-field ») à 3 et 8 semaines d'âge, les animaux non agressifs/non résistants ont une intensité de vocalisations, des tentatives de fuites et un niveau basal de cortisol plus élevés que les porcs agressifs/résistants, au contraire les porcelets agressifs/résistants ont une fréquence cardiaque plus élevée. Ces résultats suggèrent que les porcelets agressifs/résistants présentent une activité de l'axe SAM plus importante, par contre les porcelets non agressifs/non résistants possèdent une activité de l'axe HPA plus élevée. Dans une autre étude, les porcs résistants et non-résistants sont regroupés avec des congénères non familiers après le sevrage. Les porcs résistants sont plus agressifs et commencent à se battre plus rapidement (Bolhuis et al., 2005). Dans ces expériences, le statut social de chaque porc a été déterminé et ne diffère pas entre les individus des 2 groupes. Ainsi, les porcs les plus agressifs ne sont pas obligatoirement les porcs dominants.

La puissance prédictive du « backtest » comme indicateur de l'adaptatibilité des porcs est controversée (Spake et al., 2012). Lors d'un test d'exploration d'un nouvel objet ou lors d'un test résident-intrus, aucune différence de comportement n'est observée entre les porcs résistants et non-résistants. Néanmoins, ce test reste le plus utilisé aujourd'hui.

La réponse aux agents stressants peut être aussi influencée par la présence de congénères familiers (Reimert et al., 2014). La notion de support social renvoie à la capacité d'un ou plusieurs partenaires à diminuer le stress d'un individu. Dans cette étude, les porcs résistants et non-résistants sont immobilisés dans une cage de pesée en présence ou non d'un congénère familier. Le support social n'affecte pas le comportement des porcs résistants exposés à une immobilisation. En revanche, la présence d'un congénère familier avec un porc non résistant immobilisé réduit son comportement face au stress. Le support social influence différemment les comportements des porcs résistants et non-résistants.

V-3- Le système immunitaire du porc

Si le modèle souris est très utilisé en immunologie, il existe de très grandes différences entre les souris et les humains justifiant l'utilisation du porc comme modèle en neuroimmunologie (Bailey et al., 2013).

V-3-a- Les barrières épithéliales

Comme les humains, les porcs expriment des β-défensines. La première β-défensine porcine découverte est la pBD-1, qui est exprimée notamment dans les cellules épithéliales de la langue (Shi et al., 1999). Des ARNm codant la pBD-1 ont été également retrouvés dans les épithéliums des voies respiratoires (de la cloison nasale aux poumons) et gastro-intestinales (de l'œsophage au rectum).

Depuis, par homologie de séquence avec 57 séquences de β-défensines identifiées dans diverses espèces, 29 β-défensines putatives ont été décrites chez le porc (Choi et al., 2012) dont 10 déjà connues (Sang et al., 2006). Les ARNm codant ces différentes β-défensines porcines sont exprimés dans l'intestin grêle, les poumons, la rate, le thymus, les reins et les tissus testiculaires.

Chez l'homme, les 2 types de défensines (α- et β-défensines) possèdent une activité anti-microbienne. À ce jour, la présence des α-défensines chez le porc n'a pas été démontrée (Sang et al., 2006).

V-3-b- Les organes lymphoïdes

À la différence de l'homme, deux types de plaques de Peyer ont été identifiés chez le porc, dans l'iléon et dans le jéjunum (Barman et al., 1997). Néanmoins, les plaques de Peyer iléales du porc ne sont pas reconnues comme des organes lymphoïdes. Les plaques de Peyer jéjunales sont les homologues des plaques de Peyer iléales présentes chez l'homme et constituent des organes lymphoïdes secondaires.

Chez le porc, les ganglions lymphatiques ont une structure inversée (Binns, 1982). Le cortex et les follicules sont situés dans la région centrale des ganglions lymphatiques et le paracortex et la medulla sont situés en périphérie. Les lymphocytes rentrent dans les ganglions lymphoïdes soit par voie lymphatique soit par voie sanguine et la majorité des lymphocytes sort directement dans le sang.

Néanmoins, ces différences ne semblent pas apporter de modifications dans la fonctionnement du système immunitaire (Rothkötter, 2009). La moelle osseuse et le thymus sont des organes lymphoïdes primaires impliqués dans la génération et le développement des leucocytes. Comme chez les autres espèces, les LT sont maturés dans le thymus. La rate représente un organe lymphoïde secondaire important dans la recirculation des lymphocytes.

V-3-c- Les cellules immunitaires

Le développement des outils immunologiques chez le porc a permis d'étudier les différents phénotypes des cellules immunitaires porcines (Figure 23).

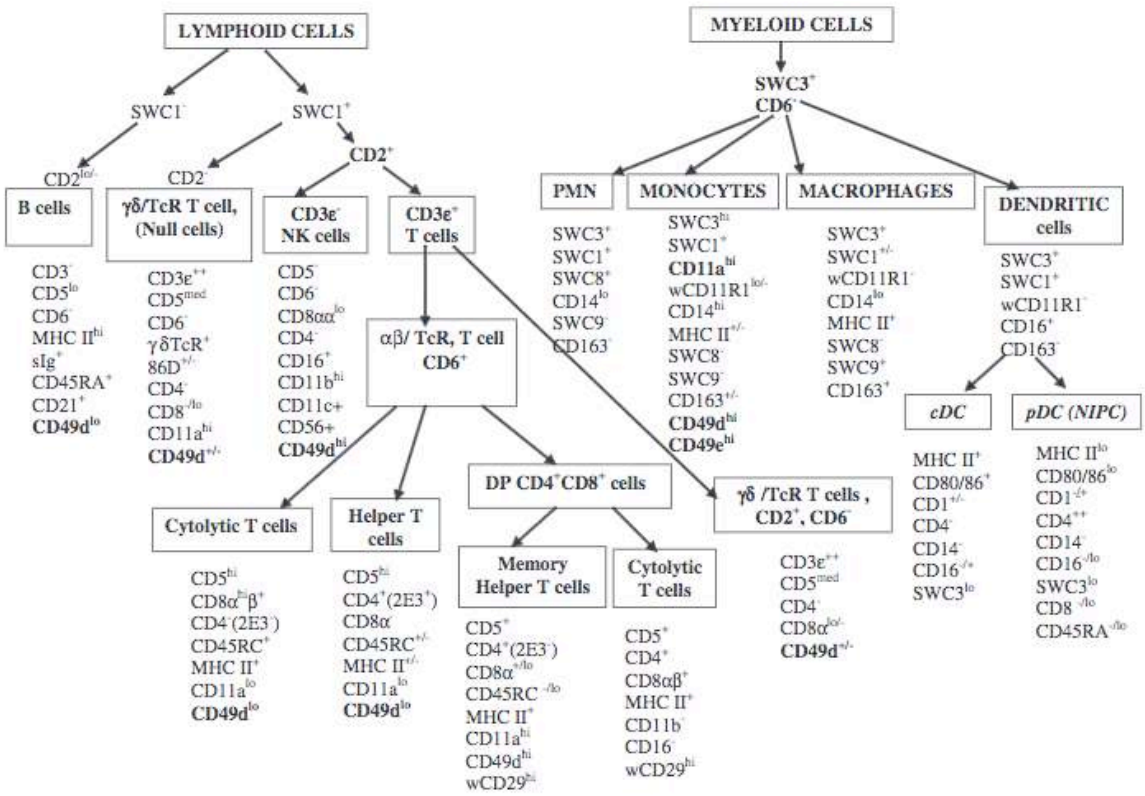


Figure 23- Marqueurs permettant d'identifier les différents types cellulaires du système immunitaire chez le porc (Piriou-Guzylack and Salmon, 2008) cDC, cellule dendritique conventionnelle ; Cytolytic T cell, LT cytotoxique ; DP, double positive ; Helper T cell, LT auxilliaire ; pDC, cellule dendritique plasmacytoïde et PMN, granulocyte.

- Les lymphocytes B porcins

Chez le porc, deux anticorps sont principalement utilisés pour l'identification des LB : les anticorps anti-CD2 et anti-CD21 (Sinkora and Butler, 2016). Quatre sous-populations de LB matures sont identifiées : les LB $CD2^+CD21^+$ (LB naïfs), les LB $CD2^-CD21^+$ (LB activés), les LB $CD2^+CD21^-$ (LB effecteurs) et les cellules $CD2^-CD21^-$ sont des plasmocytes produisant des anticorps.

Les Ig porcines ont été clonées et caractérisées (Butler et al., 2009). Deux chaines légères (κ et λ) et 5 isotypes de chaines lourdes (IgG, IgA, IgM, IgE et IgD) ont été identifiées chez le

porc. Les IgG sont les principales Ig circulantes chez le porc. Comme chez l'homme, elles sont hétérogènes et six sous-isotypes ont été identifiés : IgG1 à 6. Contrairement à l'homme, les IgA sériques, sécrétées par les muqueuses, circulent principalement sous forme de polymères (Snoeck et al., 2006). Enfin, en dépit de l'identification d'un gène Igδ codant l'IgD, il n'existe aucune preuve de l'existence de la protéine IgD chez le porc.

- Les lymphocytes T porcins

Concernant les LT, il existe deux grandes populations : les LTαβ et les LTγδ. Les différentes sous-populations de LT sont hétérogènes et possèdent des fonctions différentes.

A la différence de l'homme, le sang périphérique du porc contient un fort pourcentage de LT γδ (15-30%) (Hirt et al., 1990). Trois sous-populations de LT γδ (TCR^+) ont été décrites sur la base de l'expression du CD2 et du CD8 : $CD2^+CD4^-CD8^{lo}$, $CD2^+CD4^-CD8^-$ et $CD2^-CD4^-CD8^-$ (Yang and Parkhouse, 1996). Les fonctions des sous-populations de LT γδ ont été très peu étudiées. Ils reconnaissent des antigènes de manière SLA-indépendante (Tanaka et al., 1994). Il a été démontré que la vaccination de porcs à l'aide du Bacille de Calmette-Guérin entraînait une augmentation de la prolifération des LT γδ et que cette prolifération était stimulée par la sécrétion d'IL-2 par les LT $CD4^+$ (Lee et al., 2004).

Différentes sous-populations de LTαβ ont été décrites : $CD4^-CD8\alpha\beta^+$, $CD4^-CD8\alpha^{lo}$ (cellules NK), $CD4^+CD8\alpha^-$ et $CD4^+CD8\alpha^+$. Chaque population est présente dans le sang périphérique ainsi que dans les organes lymphoïdes avec des pourcentages différents suivant l'âge du porc et l'organe lymphoïde concerné (Yang and Parkhouse, 1996; Saalmüller et al., 1999). Les LT $CD4^-CD8\alpha\beta^+$ et $CD4^+CD8\alpha^-$ sont respectivement des LT cytotoxiques et des LT auxiliaires. Le porc possède un grand nombre de LT double positifs $CD4^+CD8\alpha^+$ circulants alors que chez l'homme ces cellules se trouvent principalement dans le thymus (Summerfield et al., 1996). Ces cellules proviendraient de l'activation des LT $CD4^+CD8\alpha^-$ et sont considérées comme des cellules mémoires, capables de proliférer lors d'une seconde stimulation (Zuckermann and Husmann, 1996).

Concernant les LTαβ $CD4^+CD8\alpha^-$, les différentes sous-populations ne sont que partiellement élucidées chez le porc (Figure 24).

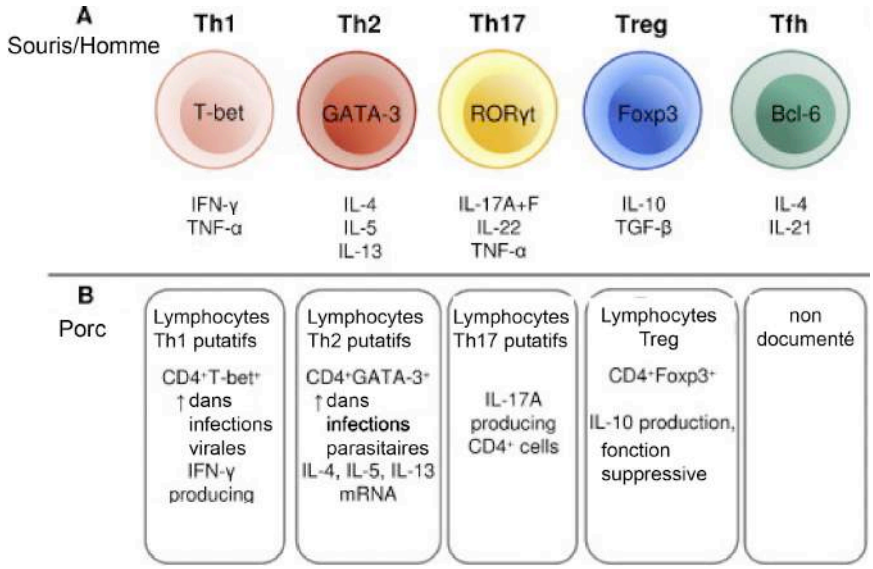


Figure 24- Etat des connaissances actuelles sur la polarisation des lymphocytes T $CD4^+$ chez le porc comparé à la souris et l'humain (d'après Gerner et al., 2015)

Les LT $CD4^+CD8\alpha^-$ Th1 et Th2 chez le porc ne sont pas aussi bien documentés que chez l'homme ou la souris. Les cellules Th1 et Th2 chez le porc expriment respectivement les facteurs de transcription T-bet et GATA-3 (Ebner et al., 2014).

Les LT CD4+ contiennent un faible pourcentage de LT régulateurs (Käser et al., 2008). Comme chez l'homme ou la souris, les Treg porcins expriment le CD25 et possèdent le facteur de transcription Foxp3.

Les LT Th17 existent aussi chez le porc (Kiros et al., 2011). La cytokine IL-17 est exprimée dans les poumons, les thymocytes et les PBMC. La présence de PMA et de ionomycine dans des cultures de thymocytes $CD4^+$ naïfs entraine une augmentation des ARNm codant les cytokines IL-21 et IL-17 ainsi que le facteur de transcription RORγt. Cette augmentation est aussi observée lorsque les cellules sont mises en culture en présence de TGF-β et d'IL-6. Ces données suggèrent que pour induire une différenciation des LT CD4+ en Th17 la présence de TGF-β et d'IL-6 est importante. Par ailleurs, le TGF-β permet aussi d'inhiber la différenciation en LT Th1.

À l'heure actuelle, seules ces 4 sous-populations de LT $CD4^+$ ont été décrites chez le porc et l'existence des lymphocytes Tfh n'a pas été encore démontrée.

V-3-d- Les molécules du système immunitaire

- La voie d'activation du NO

Une différence majeure entre les macrophages murins et humains est la voie d'activation du NO (Thomas and Mattila, 2014). Les macrophages murins stimulés par du LPS sécrètent une grande quantité de NO, provenant de l'oxydation de l'arginine métabolisée par la NO-synthase inductible (NOS2) en NO et citrulline. Au contraire, les macrophages humains traités au LPS présentent peu ou pas selon les études d'activité de NOS2. Les macrophages alvéolaires porcins n'expriment pas non plus l'enzyme NOS2 et ne produisent pas de NO (Zelnickova et al., 2008).

Une voie alternative à l'activité antimicrobienne des macrophages repose sur l'activation de l'enzyme IDO (Indoléamine 2,3-dioxygènase) qui permet la dégradation du tryptophane en kynurénine (Murray et al., 1989). Les macrophages porcins différenciés à partir de cellules de la moelle osseuse ressemblent aux macrophages humains puisqu'ils produisent des ARNm codant l'enzyme IDO lorsqu'ils sont stimulés avec du LPS mais ne produisent pas de NO (Kapetanovic et al., 2012).

- Les Toll-Like Receptors

Les TLR, récepteurs importants dans la reconnaissance des pathogènes, ont été caractérisés chez le porc. Les ADNc des TLR2 et TLR6 ont été séquencés à partir de macrophages alvéolaires porcins traités avec du LPS (Muneta et al., 2003). La séquence codante du TLR2 porcin possède 73% d'homologie avec la séquence du TLR2 humain et le TLR6 74%. Ces TLR sont fonctionnels puisque des anticorps anti-TLR2 et anti-TLR6 inhibent la sécrétion de TNF-α induite par les macrophages porcins en réponse à *Mycoplasma hyopneumoniae.*

Chez l'homme, le TLR2 activé forme des hétérodimères avec le TLR6 mais aussi avec le TLR1. La séquence du TLR1 porcin possède 79% d'homologie avec la séquence du TLR1 humain (Shinkai et al., 2006). L'expression des ARNm codant TLR1 a été analysée et détectée dans 8 tissus (colon, rein, foie, poumon, intestin grêle, rate, estomac et thymus).

Le TLR4 porcin a aussi été séquencé (Thomas et al., 2006). Il est composé de 3 exons homologues à 80% à la séquence humaine. Ses ARNm sont exprimés dans les ganglions lymphatiques, le foie et la rate.

Les séquences des TLR3 et TLR7 possèdent également 80% d'identité avec leurs homologues humains (Sang et al., 2008). Alors que les ARNm codant le TLR7 sont exprimés dans la plupart des tissus, les ARNm codant les TLR3 sont exprimés essentiellement dans les reins, la rate, le foie et le duodénum.

Le TLR9 possède 85% d'homologie avec le TLR9 humain. Le TLR9 est fortement exprimé dans les ganglions lymphatiques mésentériques (macrophages, DC et LB) et les plaques de Peyer (Shimosato et al., 2005).

- Le complexe majeur d'histocompatibilité du porc

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité chez le porc (SLA pour swine leucocyte antigen) sont très bien caractérisées. La séquence complète du chromosome 7 comprenant le système SLA a été analysée (Lunney et al., 2009). Plus de 230 loci ont été identifiés avec au moins 190 gènes fonctionnels dans la région SLA. La structure du système SLA est composée de 3 groupes de gènes constituant les régions SLA de classe I, II et III.

La région SLA de classe I est composée de 7 gènes classiques de classe I ainsi que de 3 gènes non classiques de classe I. Les gènes classiques de classe I qui s'expriment de manière permanente sont les SLA-1, SLA-2 et SLA-3. Ces gènes codent des glycoprotéines transmembranaires (α1, α2 et α3) qui lient de façon non covalente la β2-microglobuline. La glycoprotéine transmembranaire α3 est un site de liaison pour le co-récepteur CD8. Contrairement aux régions SLA de classe I et II, la région SLA de classe III a été très peu étudiée. Néanmoins, il a été démontré que la région SLA de classe III est physiquement liée à la région SLA de classe I (Renard et al., 2006).

Concernant les gènes de SLA de classe II, bien que 4 groupes différents aient été identifiés (SLA-DR, SLA-DQ, SLA-DM et SLA-DO), deux sont principalement présents à la surface des CPA: SLA-DR et SLA-DQ. Ces molécules SLA de classe II sont exprimées à la surface des CPA comme les macrophages, les DC et les LB et, de manière surprenante, elles sont également exprimées sur les lymphocytes circulants (notamment les LT $CD8^+$).

Comme chez l'humain, les loci sont polymorphes et les gènes codant les différents haplotypes lient et présentent des peptides différents.

V-4- La neuroimmunologie chez le porc

Plusieurs études ont analysé l'effet de différents agents stressants sur quelques fonctions immunitaires du porc.

Les effets d'un stress sur les réponses immunitaires ont été notamment analysés dans des modèles de DTH ou de vaccination. Il a été montré que des porcs élevés dans des conditions stressantes (mélanges, déplacements, faible surface de logement) présentent une réponse moindre à un test d'hypersensibilité retardée par rapport à leurs congénères élevés en conditions non stressantes (Ekkel et al., 1995). De Groot *et al*. ont montré que le mélange avec des congénères non familiers diminue l'efficacité de la vaccination chez les mâles castrés alors que ce même stress est sans effet chez les truies (de Groot et al., 2001). Si ces exemples mettent en évidence des effets plutôt délétères du stress sur les réponses immunitaires observées, ils révèlent également l'existence de facteurs confondants tels que le genre, l'âge ou encore la réactivité comportementale. En effet, une étude ultérieure chez des mâles a montré les effets positifs du stress (mauvaises conditions d'hébergement) sur la vaccination, ce phénomène n'étant observé que chez les animaux non-résistants (Bolhuis et al., 2003). Par ailleurs, des porcelets ayant subi un stress prénatal possèdent un taux d'IgG totales significativement plus élevé que celui des porcs contrôles à 35 jours de vie (Tuchscherer et al., 2002). Néanmoins, Couret *et al.* ont montré l'absence d'effet d'un stress prénatal sur l'efficacité d'une vaccination expérimentale contre l'ovalbumine (Couret et al., 2009a).

D'autres études ont été réalisées sur des PBMC isolés à partir d'animaux assujettis à différents types de stress. En utilisant différents tests, la fonction de différents types de cellules immunitaires a été évaluée.

Une injection de cortisol ou d'ACTH par voie *iv* est sans effet sur la cytotoxicité des cellules NK mesurée à 1h et 2h après l'injection (Salak-Johnson et al., 1996). De façon concordante, une étude a montré l'absence d'effet d'un stress de transport sur la cytotoxicité des cellules NK mesurée 4h après le stress, et ce, malgré une augmentation significative du taux de cortisol (McGlone et al., 1993). Pourtant, une autre étude a montré qu'un stress d'immobilisation module l'activité cytotoxique des NK de façon biphasique avec d'abord une augmentation rapide suivie d'une diminution au bout de 4h (Wrona et al., 2001). Au contraire, un stress chronique augmenterait la cytotoxicité des cellules NK (Sutherland et al., 2006).

La prolifération des lymphocytes induite par des mitogènes est également modulée suite à l'exposition d'un individu à un agent stressant. L'utilisation de la Con-A ou de la PHA est

classiquement utilisée pour évaluer la prolifération des LT; le LPS, pour celle des LB. L'exposition à différents agents stressants (mélange, transport, isolement répété quotidien) diminue la prolifération des LT (Deguchi and Akuzawa, 1998; Hicks et al., 1998; Kanitz et al., 2004). Concernant les LB, le stress aigu affecte peu leur capacité à proliférer (Tuchscherer et al., 2009) mais des effets différents du stress chronique ont été rapportés. Si l'isolement répété quotidien ne modifie pas la prolifération des lymphocytes B (Kanitz et al., 2004), celle-ci augmente lorsque les porcs sont soumis à un stress chronique (surpopulation, chaleur et mélange) (Sutherland et al., 2006).

Des études ont aussi étudié l'effet d'un stress prénatal sur la prolifération lymphocytaire après stimulation par le LPS ou la Con-A. Celle-ci diminue chez les porcelets d'une semaine d'âge ayant subi un stress prénatal consécutif aux isolements répétés de leur mère pendant les dernières semaines de gestation (Tuchscherer et al., 2002). Un autre étude a démontré que les PBMC isolées de porcelets ayant subi un type de stress prénatal différent, consécutif aux mélanges répétés de leur mère avec des congénères non spécifiques, prolifèrent plus suite à une stimulation à la Con-A par rapport aux porcelets contrôles (Couret et al., 2009a).

Concernant les effets d'un agent stressant sur les sous-populations lymphocytaires et la sécrétion de cytokines *ex vivo*, peu d'études ont été réalisées chez le porc. Il a néanmoins été montré qu'un isolement social pendant 4h entraine une augmentation de la proportion de LT $CD8^+$ circulants (significative seulement chez les porcelets âgés de 7 jours) et une diminution des sécrétions d'IL-1β et d'IL-10 induites par le LPS dans des cultures de sang total (significative chez les porcelets âgés de 21 jours) (Tuchscherer et al., 2009). D'autre part, Couret *et al* ont mis en évidence une baisse du ratio $CD4^+$/ $CD8^+$ chez des porcelets âgés de 4 jours et ayant subi un stress prénatal (Couret et al., 2009b).

Le porc est un animal social, anatomiquement et physiologiquement semblable à l'homme, justifiant son utilisation comme modèle pour de nombreuses maladies humaines telles que les maladies cardiovasculaires et la mucoviscidose.

Le séquençage des différents gènes codant les molécules impliquées dans l'immunité a démontré que les séquences porcines avaient au moins 70% d'homologie avec les séquences humaines. De plus, l'organisation du système immunitaire porcin obéit aux mêmes règles que le système immunitaire de l'homme.

Lorsqu'il est exposé à un agent stressant, les réponses neuroendocriniennes du porc sont comparables à celles de l'homme, ce qui fait de lui un modèle pertinent en neuroimmunologie.

En tant qu'animal de production, le porc est exposé à de multiples agents stressants, potentiellement délétères sur l'immunité.

Les objectifs de la thèse

Les conséquences d'une exposition aigüe ou chronique à un agent stressant sont de plus en plus étudiées chez les rongeurs et l'homme mais peu chez le porc. Pourtant, le porc est un animal social exposé à de nombreux évènements stressants en élevage intensif susceptibles de diminuer les performances zootechniques et de favoriser le développement des maladies infectieuses.

L'objectif général de ma thèse est d'étudier les effets d'un agent stressant sur l'immunité porcine tout d'abord (i) à l'échelle de l'individu, dans un modèle de stress social aigu, puis (ii*)* à l'échelle cellulaire, en analysant spécifiquement les effets des catécholamines sur les fonctions des macrophages.

Premier objectif : Analyser les effets d'un stress social aigu chez des porcelets fortement et faiblement répondeurs à une injection d'ACTH.

Un objectif en élevage est d'améliorer la robustesse des individus, c'est-à-dire leur capacité à s'adapter à différentes conditions environnementales (Knap, 2005). Ainsi, augmenter la robustesse des individus doit permettre d'augmenter leur résilience au stress. Nos collaborateurs ont suggéré que l'axe HPA, et notamment le cortisol, jouerait un rôle central dans le compromis entre performances de production et robustesse (Mormède et al., 2011). Dans ce contexte, comme moyen d'augmenter la robustesse, ils ont proposé la sélection génétique de porcelets sur la force de l'axe corticotrope, évaluée par un test de réponse à une stimulation par l'ACTH.

Ainsi, la première partie de ma thèse concerne, d'une part, les effets du stress sur des paramètres immunitaires choisis et, d'autre part, la comparaison de ces effets chez des porcelets fortement et faiblement répondeurs à une injection d'ACTH.

Le mélange de porcelets avec des congénères non familiers étant une pratique courante en élevage porcin, nous avons choisi ce protocole comme stress social aigu.

Second objectif : Décrire les effets des catécholamines sur les fonctions des macrophages porcins.

Les macrophages sont des cellules de l'immunité innée participant activement à l'élimination des pathogènes. Alors que les effets des glucocorticoïdes sur les fonctions des macrophages ont été très largement étudiés, les conséquences de l'exposition des macrophages aux catécholamines restent peu claires.

Ainsi, la seconde partie de ma thèse concerne les effets des catécholamines sur les macrophages porcins dérivés de progéniteurs hématopoïétiques.

PREMIERE ETUDE EXPERIMENTALE

Effets d'un stress social aigu sur l'immunité porcine

Bacou et al, Physiol Behav, 2017

PREMIERE ETUDE EXPERIMENTALE : Effets d'un stress social aigu sur l'immunité porcine

Objectif : Le but de cette étude était d'analyser les effets d'un stress social aigu sur les paramètres neuroendocriniens et immunitaires chez des porcelets sélectionnés selon la force de leur axe HPA.

Matériel et méthodes : Pour cela, deux types de porcelets, HPA^{lo} et HPA^{hi}, appartenant à la deuxième génération de sélection génétique divergente basée sur la réponse au cortisol suite à une injection d'ACTH, ont été utilisés. Trois lots expérimentaux comprenant chacun 15 porcs HPA^{lo} et 15 porcs HPA^{hi} ont été inclus dans l'étude. Pour induire un stress social aigu, les porcs ont été placés pendant une heure en présence de congénères non familiers dans une loge adjacente. Des prélèvements sanguins ont été effectués juste avant et immédiatement après le mélange. Pour les paramètres neuroendocriniens, les taux de cortisol, d'Ad et de NA ont été analysés. Concernant les paramètres immunitaires, les populations leucocytaires et sous-populations lymphocytaires ont été dénombrées, les sécrétions de cytokines induites par le LPS ou par un mélange PMA, ionomycine et LPS dans des cultures de sang total et la phagocytose ont été analysées. L'analyse statitistique a été réalisée en utilisant un modèle linéaire à effets mixtes pour décrire les conséquences d'un stress social aigu sur les paramètres neuroendocriniens et immunitaires chez les porcs HPA^{lo} et HPA^{hi}. Une analyse en composantes principales a été utilisée pour décrire les effets du stress et du phénotype des porcelets sur l'ensemble des données.

Résultats : Parmi les paramètres analysés, seize sont significativement affectés uniquement par le stress social aigu alors que trois sont affectés par le mélange et le phénotype des porcs.

Le stress social aigu augmente les concentrations plasmatiques de NA et de cortisol chez les porcs HPA^{lo} et HPA^{hi} (Fig 1). De plus, la concentration plasmatique basale de cortisol est plus élevée chez les porcs HPA^{hi} comparés aux porcs HPA^{lo} (Fig 1A).

Le mélange de porc induit aussi une augmentation du nombre de leucocytes circulants (granulocytes, monocytes et lymphocytes) (Fig 2). Parmi les sous-populations

lymphocytaires, les nombres de LT $CD8\alpha^{hi}CD4^{-}$ et de LT $CD8\alpha^{med}CD4^{-}$ augmentent, au contraire des nombres de LT $CD4^{+}CD8\alpha^{-}$ et de $CD21^{+}$ qui diminuent (Fig 3). Les sécrétions de TNF-α et d'IL-8 induites par le LPS (Fig 5) ainsi que la capacité de phagocytose des cellules mononuclées (Fig 6) sont réduites après une heure de mélange. Ces résultats sont observés chez les porcs HPA^{lo} et HPA^{hi}.

Le phénotype des porcs module aussi certains paramètres immunitaires. Les porcs HPA^{hi} possèdent un nombre de cellules $CD4^{+}CD8\alpha^{-}$, une sécrétion de TNF-α induite par le LPS et une sécrétion d'IL-8 induite par le mélange ionomycine, LPS et PMA plus importants que les porcs HPA^{lo} (Fig 4). L'analyse en composantes principales suggère que l'effet du stress social aigu est moins prononcé chez les porcs HPA^{hi} par rapport aux porcs HPA^{lo} (Fig 7).

Conclusion et discussion :

- Un mélange de porcs avec des congénères non familiers active les axes HPA et SAM.

- Un stress social aigu, chez le porc, induit une mobilisation spécifique des leucocytes circulants et une diminution des fonctions des cellules sanguines tel que démontré chez l'homme.

- Si la plupart des paramètres immunitaires analysés ne diffère pas entre les porcelets HPA^{lo} et HPA^{hi}, les valeurs de trois paramètres sont supérieures chez les porcelets HPA^{hi}.

- Une analyse globale des données suggère que les porcelets HPA^{hi} seraient plus résilients à un agent stressant que leurs congénères HPA^{lo}.

A l'issue de ce travail, nous pensons que la réduction des agents stressants en élevage associée à la sélection génétique des porcs sur la force de l'axe HPA pourraient contribuer à la réduction des intrants médicamenteux dans la filière porcine.

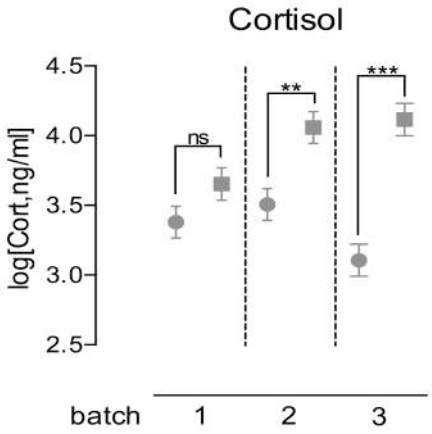
Supplemental tables and figure legends

Supplemental Table 1. Results of the statistical analysis for batch and interaction effects. For each parameter, in the linear mixed-effects model, the effects of batch and interactions involving batch were tested using the Wald-Chi square test. A *p*-value <0.05 was considered as significant.

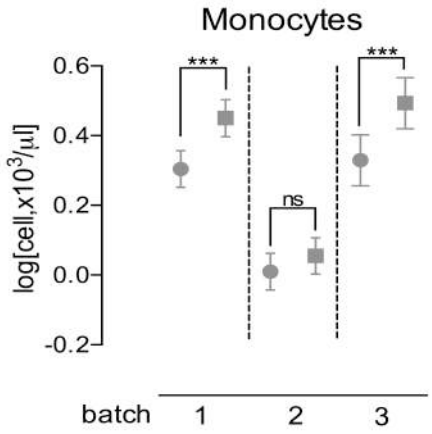
Parameters	Batch	Batch×Mixing	Batch×HPA	Batch×Mixing×HPA
Cortisol	0.08	<0.01	0.48	0.47
Epinephrine	0.07	<0.05	0.24	<0.05
Norepinephrine	0.17	0.62	0.71	0.20
Granulocytes	0.18	0.83	0.95	0.73
Lymphocytes	<0.001	0.48	0.75	0.53
Monocytes	<0.001	<0.01	0.39	0.93
$CD8\alpha^{hi}$ $CD4^-$ cells	0.11	0.92	0.63	0.81
$CD8\alpha^{med}$ $CD4^-$ cells	<0.001	<0.05	0.09	0.16
$CD4^+$ $CD8\alpha^+$ lymphocytes	<0.001	<0.05	0.96	0.97
$CD4^+$ $CD8\alpha^-$ lymphocytes	<0.01	0.40	0.16	0.89
$CD21^+$ lymphocytes	<0.01	<0.05	0.93	0.93
% phagocytes in mononuclear cells	<0.001	0.06	0.11	0.43
LPS-induced IL-8 secretion	<0.001	0.38	0.37	0.87
LPS-induced TNFα secretion	<0.001	<0.001	0.90	0.11
LPS-induced IL-10 secretion	<0.001	<0.01	0.07	0.25
PIL-induced IL-8 secretion	<0.05	0.91	0.67	0.46
PIL-induced TNFα secretion	<0.001	0.05	0.13	<0.05
PIL-induced IL-10 secretion	<0.001	0.28	0.97	0.99

Supplemental Table 2. Variables' cos^2 values in the first two principal dimensions of the PCA.

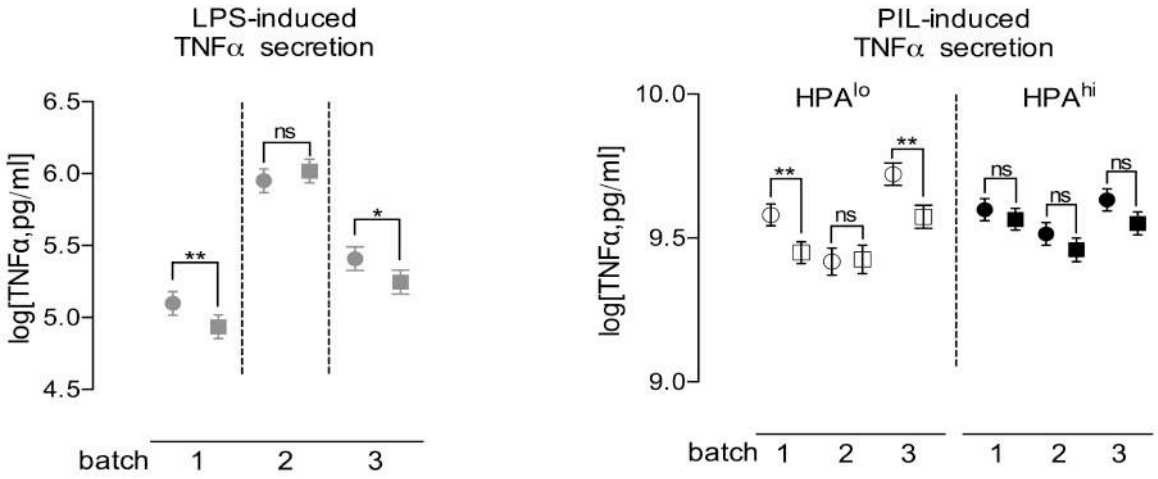
	Dim. 1	Dim. 2
Lymphocytes	0.8159	0.0154
Monocytes	0.6823	0.0171
$CD8\alpha^{med}$ $CD4^-$ cells	0.5544	0.0368
$CD4^+$ $CD8\alpha^+$ cells	0.4525	0.0003
$CD8\alpha^{hi}$ $CD4^-$ cells	0.4245	0.0145
Granulocytes	0.4022	0.0059
% phagocytes in mononuclear cells	0.2475	0.1346
Norepinephrine	0.2374	0.1745
PIL-induced IL-10 secretion	0.1868	0.0644
$CD21^+$ lymphocytes	0.1602	0.1960
$CD4^+$ $CD8\alpha^-$ lymphocytes	0.1343	0.3380
LPS-induced TNFα secretion	0.1182	0.0328
Cortisol	0.1038	0.2203
Epinephrine	0.0487	0.2652
PIL-induced IL-8 secretion	0.0247	0.0814
PIL-induced TNFα secretion	0.0026	0.4078
LPS-induced IL-10 secretion	0.0001	0.2024
LPS-induced IL-8 secretion	0.0000	0.3169



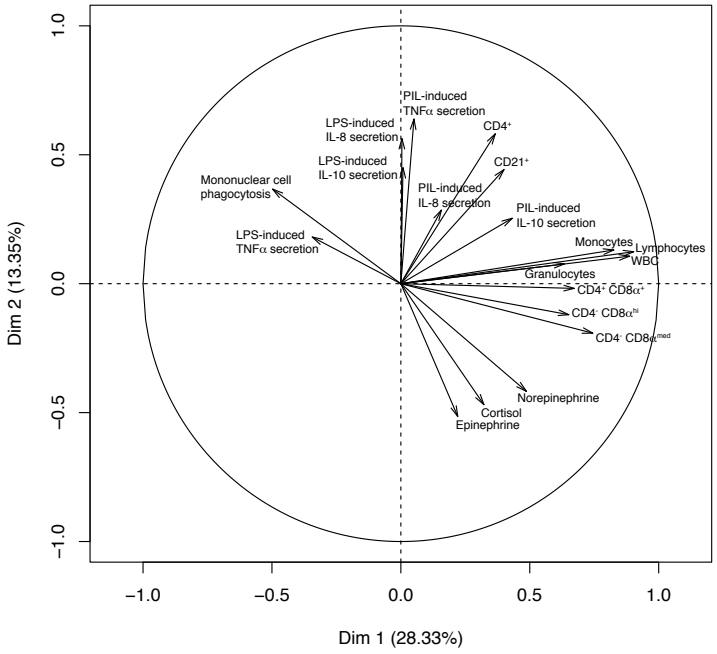
Supplemental Fig. 1. Cortisol levels before and after mixing per batch. Cortisol levels in plasma of piglets just before (circles) and right after (squares) one-hour mixing. Data are expressed as LS-means +/- SE. *p*-values were calculated using the Tukey-Kramer procedure, with stars denoting statistical significance between before and after mixing in each batch.



Supplemental Fig. 2. Monocyte numbers before and after mixing, batch per batch. Monocyte numbers just before (circles) and right after (squares) one-hour mixing. Data are expressed as LS-means +/- SE. *p*-values were calculated using the Tukey-Kramer procedure, with stars denoting statistical significance between before and after mixing in each batch.



Supplemental Fig. 3. Cytokine secretions in WBA before and after mixing, batch per batch. LPS- (left) and PIL- (right) induced TNFα secretions in WBA just before (circles) and right after (squares) one-hour mixing. Data are expressed as LS-means +/- SE. *p*-values were calculated using the Tukey-Kramer procedure, with stars denoting statistical significance between before and after mixing in each batch (left) or for each batch and each HPA axis activity (right).



Supplemental Fig. 4. Results of PCA performed on log-transformed data. Variables' factors map in the first factorial plane is shown.

DEUXIEME ETUDE EXPERIMENTALE

Effets des catécholamines sur les macrophages porcins

Bacou *et al*, manuscrit en préparation

DEUXIEME ETUDE EXPERIMENTALE : Effets des catécholamines sur des macrophages porcins

I- Introduction

Les macrophages sont des cellules de l'immunité innée dont les fonctions sont (i) l'élimination de pathogènes lors d'une infection et (ii) le maintien de l'homéostasie tissulaire. Bien qu'historiquement décrits comme étant issus de la différenciation des monocytes circulants, cette théorie est aujourd'hui remise en cause. En effet, les macrophages tissulaires résidents de l'adulte proviennent principalement du sac vitellin de l'embryon et sont capables de s'auto-renouveler (Schulz et al., 2012; Hashimoto et al., 2013). En cas d'inflammation, les macrophages résidents et des macrophages issus de la différenciation de monocytes circulants participent conjointement à la résolution de l'inflammation. Les macrophages dans leur ensemble ont la capacité de répondre à différents stimuli environnementaux ce qui se traduit par l'expression de différents phénotypes.

Les phénomènes d'activation et de polarisation des macrophages ont été largement étudiés *in vitro*. Les études les plus anciennes décrivent deux populations de macrophages aux fonctions opposées : les macrophages M1 et M2. Les macrophages M1 sont de type pro-inflammatoire, ils sont activés par l'IFN-γ et par les PAMPs et sécrètent en retour des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α et l'IL-12 pouvant induire des réponses immunitaires de type Th1 (revu par Martinez et al., 2008). Les macrophages M1 produisent également du monoxyde d'azote et des métabolites de l'oxygène connus pour être des agents antimicrobiens (Stuehr and Marletta, 1985). Les macrophages M2, au contraire, vont plutôt réduire l'inflammation et faciliter la cicatrisation. Ils ont été initialement décrits comme exprimant le récepteur au mannose en réponse à une stimulation par l'IL-4 (Stein et al., 1992). Les macrophages M2 sécrètent de l'IL-10 participant à une réponse de type Th2 (Sutterwala et al., 1998) et possèdent une forte activité arginase (Munder et al., 1998). D'autres différences entre les populations de macrophages M1 et M2 ont été mises en évidence plus récemment. Les macrophages M1 expriment plutôt les chimiokines CXCL10 et IL-8 alors que les macrophages M2 expriment surtout CCL17 (Mantovani et al., 2004). Concernant l'activation des facteurs de transcription, STAT1 et IRF5 seraient impliqués dans le phénotype M1 et STAT6 et IRF4 dans le phénotype M2 (Lawrence and Natoli, 2011).

Il est maintenant admis que cette nomenclature M1/M2 résulte d'une simplification excessive et qu'elle ne traduit pas la diversité des phénotypes de macrophages. Par exemple, la population de macrophages M2 peut elle-même être subdivisée en trois sous-populations. Les macrophages M2a, activés par l'IL-4 et l'IL-13, entraînent des réponses de type Th2 et participent à l'élimination des parasites, comme les macrophages M2b, qui sont, quant à eux, activés par des complexes immuns en présence de ligands TLR. Les macrophages M2c, activés par l'IL-10 ou les GC participent au remodelage tissulaire et induisent une immunorégulation (revu par Martinez and Gordon, 2014).

Plus généralement, il est difficile de compiler et de comparer les différents résultats publiés, puisque l'obtention des macrophages et les conditions de culture et d'activation varient d'une étude à l'autre. C'est pourquoi, il a été récemment proposé que soient systématiquement et clairement indiqués en plus de l'espèce utilisée, les temps et conditions de culture, le facteur de croissance utilisé et sa concentration et les conditions d'activation des macrophages *in vitro* (Murray et al., 2014). Les macrophages pourraient alors être nommés suivant les activateurs utilisés. Ainsi, les macrophages M1 seraient appelés les macrophages M(LPS), M(LPS + IFN-γ) ou M(IFN-γ) et les macrophages M2 seraient appelés M(IL-4), M(complexes immuns), M(IL-10), M(GC + TGF-β) ou M(GC).

Dans les tissus, à l'état basal, les macrophages résidents maintiennent l'homéostasie tissulaire en éliminant les débris cellulaires. Ces macrophages ont plutôt un phénotype de type M2. Lors d'une infection, les macrophages résidents sont activés et se différencient en macrophages de type M1. Ces macrophages sécrètent des cytokines pro-inflammatoires permettant le recrutement au site infectieux de neutrophiles et de monocytes qui vont se différencier. L'infection terminée, les macrophages initient le retour à l'état d'équilibre en éliminant les débris cellulaires et en réparant les tissus (Murray and Wynn, 2011).

Les agents stressants induisent la libération de glucocorticoïdes et de catécholamines. Les différents effets des glucocorticoïdes sur les macrophages ont été largement étudiés. En revanche, les effets des catécholamines sur les macrophages ont été peu décrits y compris dans les modèles murins. L'ajout d'Ad dans une culture de macrophages spléniques ou dérivés de cellules de moelle osseuse de souris diminue les sécrétions de TNF-α et d'IL-6 et augmente la sécrétion d'IL-10, induites par le LPS. Ces effets sont prévenus par un antagoniste des récepteurs ADRβ2 (Deng et al., 2004; Muthu et al., 2005). Des résultats similaires, ainsi qu'une diminution de l'expression de la protéine iNOS de nitrite et de la phosphorylation de la protéine ERK1/2, ont été obtenus avec les macrophages péritonéaux de

rat traités par un agoniste des récepteurs ADRβ2 en présence de LPS (Tanaka et al., 2010). Au contraire, la NA, *via* la stimulation des récepteurs ADRα, augmente la sécrétion de TNF-α et la phosphorylation des protéines ERK1/2, JNK et p38 de macrophages péritonéaux murins traités au LPS (Huang et al., 2012). Il a également été montré que l'activation du récepteur ADRα2 induisait une résistance des macrophages à l'infection par *Mycobacterium avium* (Weatherby et al., 2003). Concernant la phagocytose, l'Ad augmente le taux et l'index de phagocytose d'*E.coli* des macrophages péritonéaux de rat traités au LPS (Zhou et al., 2014). Au contraire, un traitement à la NA de macrophages de souris isolés à partir d'une blessure diminue leur index de phagocytose (Gosain et al., 2007). Cette diminution PKA-dépendante n'est pas observée avec l'ajout d'antagonistes des récepteurs ADRα et ADRβ. Ainsi, suivant le(s) récepteur(s) adrénergique(s) activé(s), les effets des catécholamines sur la réponse immunitaire des macrophages ne sont pas les mêmes. D'une manière générale, la stimulation β2-adrénergique par les catécholamines diminue les réponses pro-inflammatoires des macrophages alors que l'activation du récepteur α2-adrénergique les augmente

D'importantes différences inter-espèces rendent difficile l'extrapolation à l'homme des résultats obtenus dans les modèles murins (Schneemann and Schoeden, 2007). De plus, les quelques études réalisées chez l'homme ont surtout utilisé des lignées cellulaires comme la lignée THP-1 ou des monocytes et non des macrophages. Aussi, l'utilisation de macrophages porcins différenciés à partir de cellules de moelle osseuse en présence de rhM-CSF (recombinant human Macrophage-Colony Stimulating Factor) nous est apparue comme un outil intéressant pour approfondir l'effet des catécholamines sur les macrophages. De plus, les macrophages porcins, lorsqu'ils sont stimulés avec du LPS, ne produisent pas de NO, expriment les messagers codant l'enzyme IDO ainsi qu'un certain nombre de gènes similaires aux macrophages humains (Kapetanovic et al., 2012).

Dans cette étude, les macrophages différenciés à partir de progéniteurs hématopoïétiques ont été caractérisés. Nous avons ensuite étudié les effets des catécholamines sur certaines de leurs fonctions.

II- Matériel et méthodes

Obtention des macrophages porcins

Les macrophages porcins (BMM pour Bone Marrow-derived Macrophages) sont obtenus par différenciation de progéniteurs issus de la moelle osseuse extraite de fémurs de porcs Large-White nouveaux-nés (5-14 jours). Les cellules de moelle osseuse sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (PAA, Velizy-Villacoublay, France) contenant 10% de sérum de veau fœtal, 1% de streptomycine/penicilline, 1% de L-glutamine en présence de 10^4 U/ml de rhM-CSF (Miltenyi-Biotech, Bergish Gladbach, Allemagne). Généralement, les BMM sont cultivés sur du plastique non traité pour la culture cellulaire.

Après 6 jours de culture, les cellules sont décollées à l'aide d'Accutase® (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Flallavier, France) et ensemencées en plaques. Le lendemain, les cellules non adhérentes sont éliminées et les cellules adhérentes sont traitées avec du LPS *Escherichia coli* 0111:B4 (10 ng/ml ; Sigma-Aldrich) avec ou sans adrénaline (Ad ; 10^{-7} M ; Sigma-Aldrich), noradrénaline (NA ; 10^{-7} M ; Sigma-Aldrich) ou formotérol (agoniste spécifique des récepteurs β2 adrénergiques ; 10^{-9} M ; Tocris Biosciences, Bristol UK) en présence ou en absence d'ICI 118-551 (antagoniste spécifique des récepteurs ADRβ2 ; 10^{-5} M ; Tocris Biosciences). Le terme « expériences indépendantes » se réfère généralement à des expériences réalisées sur des cellules provenant de porcelets différents, ou a minima provenant de différenciations indépendantes.

Analyse du phénotype par cytométrie de flux

Après 6 jours de culture, les cellules sont caractérisées avec différents anticorps murins fluorescents: un anti-pCD14 FITC (clone MIL2), un anti-SLAII DR FITC (clone 2E9/13), un anti-pCD16 PE (clone G7), un anti-pCD163 PE (clone 2A10/11) ou les contrôles isotypiques correspondants (IgG2b FITC et IgG1 PE). Après marquage (20mn à 4°C), les cellules sont lavées et phénotypées par cytométrie de flux [FACS Aria (BD Biosciences, Le Pont le Claix, France)]. Les données sont analysées en utilisant le logiciel FlowJo (FlowJo, Ashland, Oregon).

RT-PCR classiques et RT-PCR quantitatives en temps réel

Les ARN polyA de BMM (3-3,5×10^6 cellules) sont extraits à l'aide du kit Dynabeads mRNA DIRECT (Thermo Fisher Scientific). Ensuite, les ADNc sont synthétisés par la

transcriptase reverse SuperScript®IV (Thermo Fisher Scientific) avec des amorces de 15 nucléotides de séquences aléatoires (random primers R15). Pour chaque échantillon, un contrôle sans l'enzyme SuperScript®IV a été réalisé. Pour les PCR, les séquences d'amorces spécifiques de chaque gène ont été conçues en utilisant le logiciel Primer3Plus (Tableau 4).

Les PCR classiques ont été utilisées pour détecter la présence des ARN messagers codant les récepteurs adrénergiques dans les BMM. Les couples d'amorces ont été validés sur du cœur et du poumon de porcs Yucatan. Les échantillons ont été amplifiés en utilisant le mix Firepol® Master Mix (Solis Biodyne, Tartu, Estonie) pendant 35 cycles (95°C – 30 sec ; 60/63°C – 45 sec ; 72°C – 45 sec) et les produits de PCR ont été déposés sur un gel d'agarose 2%.

Les PCR quantitatives en temps réel ont été réalisées à l'aide du mix HOT Firepol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis Biodyne) en plaque 96 puits blanche. Tous les échantillons ont été testés en duplicats et la moyenne de Ct a été calculée. Pour comparer l'expression des gènes entre les BMM non traités et les BMM traités au LPS, la méthode de comparaison des différences de Ct a été utilisée. Pour analyser l'effet du formotérol sur des BMM traités au LPS, la moyenne des Ct a été comparée à une courbe standard spécifique de chaque gène pour déterminer la quantité relative des ARN messagers. Dans les deux cas, les résultats ont été rapportés à l'expression des gènes de ménage : la β-actine (*ACTB*) et la protéine ribosomale L19 (*RPL19)*.

Analyse des productions de cytokine

Après 24h de traitement en plaque en plastique traité culture, les surnageants de culture sont collectés, centrifugés et stockés à -80°C. Les concentrations de TNF-α, d'IL-8, d'IL-12p40, d'IL-6 et d'IL-10 ont été analysées par la méthode ELISA (Duoset ; R&D Systems, Abington, UK) selon le protocole indiqué par le fournisseur.

Production et marquage des bactéries *E.coli*

Les bactéries *E.coli* (ATCC® 25922™) sont cultivées dans du milieu LB (Luria-Bertani) jusqu'à leur phase de croissance exponentielle. Après centrifugation et inactivation par la chaleur (incubation à 65°C pendant 30 min), les bactéries sont marquées pendant 1h dans le noir soit avec l'Alexa Fluor® 647 succinimidyl ester (AF647 ; Thermo Fisher Scientific) pour les expériences de phagocytose, soit avec deux fluorochromes l'AF647 et le fluorescein-5-isothiocyanate Isomer I (FITC; Thermo Fisher Scientific) pour les expériences d'acidification du phagosome. Les bactéries marquées sont ensuite opsonisées pendant 30 min à 37°C dans

du PBS contenant 50% de sérum de porc inactivé.

Analyse de la phagocytose

Après 3h de traitement, les cellules sont décollées à l'aide d'Accutase® et incubées pendant 20 min à 37°C avec des bactéries *E.coli* marquées avec de l'AF647 (à un ratio de 4 bactéries pour 1 BMM). Ensuite, les BMM sont lavés avec du PBS 5 mM EDTA pour éliminer les bactéries restées à leur surface et le pourcentage de phagocytose est immédiatement évalué par cytométrie de flux. Pour chaque expérience, un témoin négatif (correspondant aux cellules incubées avec les bactéries à 4°C) est réalisé.

Mesure de l'acidification du phagosome

Après 3h de traitement, les BMM sont décollés à l'aide d'Accutase® et incubés pendant 15 min à 37°C avec des bactéries *E.coli* doublement marquées avec de l'AF647 (insensible au pH) et du FITC (sensible au pH), selon le ratio 4 bactéries pour 1 BMM. Ensuite, les cellules lavées avec du PBS contenant 5 mM EDTA sont incubées à 37°C pendant différents temps. La moyenne de l'intensité de fluorescence de l'AF647 et du FITC des cellules étant directement mesurée par cytométrie de flux, on détermine le ratio des moyennes de fluorescence AF647/FITC pour chaque point de cinétique. Pour la courbe standard, après 2h d'incubation à 37°C, les cellules sont perméabilisées avec des solutions de pH différent (3,5-8,5) contenant 0,05% de Triton X-100. L'extrapolation à la courbe standard de pH permet d'obtenir les valeurs de pH des points de cinétique (Figure 25).

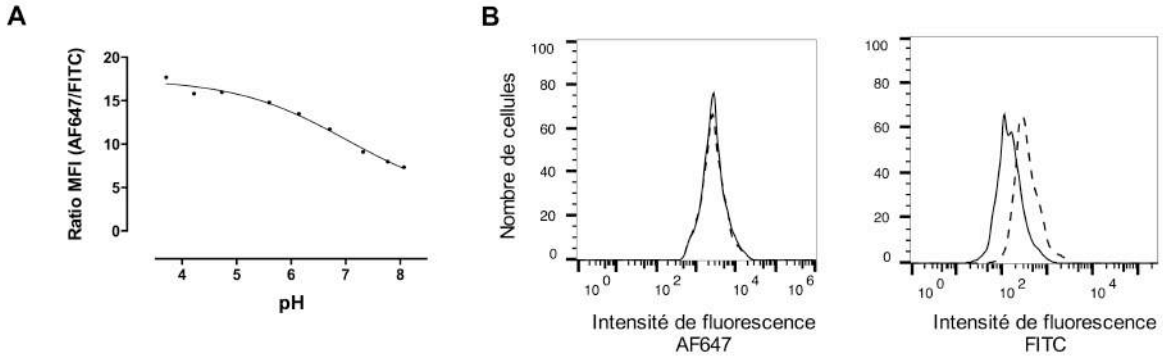


Figure 25- Analyse de l'acidification du phagosome. Courbe standard de pH : les BMM ayant phagocyté des bactéries *E.coli* co-marquées avec de l'AF647 et du FITC sont traités avec des tampons de pH différent. Le ratio de fluorescence AF647/FITC est reporté en fonction du pH (A). Les profils de fluorescence de l'AF647 (insensible au pH) et du FITC (sensible au pH) sont représentés pour les cellules dans la solution de pH 3,7 (ligne pleine) et de pH 8,1 (ligne pointillée) (B). Données représentatives de 3 expériences indépendantes.

Mesure de la production des ions superoxydes par chimioluminescence

Après 18h de traitement, les BMM, préalablement ensemencés dans une plaque 96 puits blanche à fond clair, sont incubés dans du milieu RPMI 1640 contenant de la HRP (Horseradish peroxydase, 8 U/ml, Sigma-Aldrich) et du luminol (50 µM, Sigma-Aldrich). Le niveau basal de chimioluminescence est mesuré toutes les 2 min pendant 10 min. Ensuite, du PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, 0.2 µM, Sigma-Aldrich) est ajouté pour induire la production des dérivés réactifs de l'oxygène et la chimioluminescence est mesurée immédiatement puis toutes les 2 min pendant 2h. Pour chaque condition de traitement des cellules, la chimioluminescence d'un témoin sans PMA est aussi mesurée pendant 2h. L'émission de photons est exprimée en unités de lumière arbitraire (RLU : Relative Light Units) et, pour chaque point de cinétique, la valeur de RLU sans PMA est soustraite à celle obtenue en présence de PMA.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées en utilisant le logiciel GraphPad Prism version 6.0. Pour les analyses multi-groupes, le test non paramétrique de Kruskall-Wallis a été utilisé et pour les analyses de deux groupes, le test non paramétrique de Mann-Whitney. Les résultats sont considérés comme significativement différents lorsque $p<0,05$.

III- Résultats

III-1- Les BMM porcins expriment les marqueurs de macrophage

Le phénotype des cellules porcines de moelle osseuse différenciées pendant 6 jours en présence de rhM-CSF a été analysé.

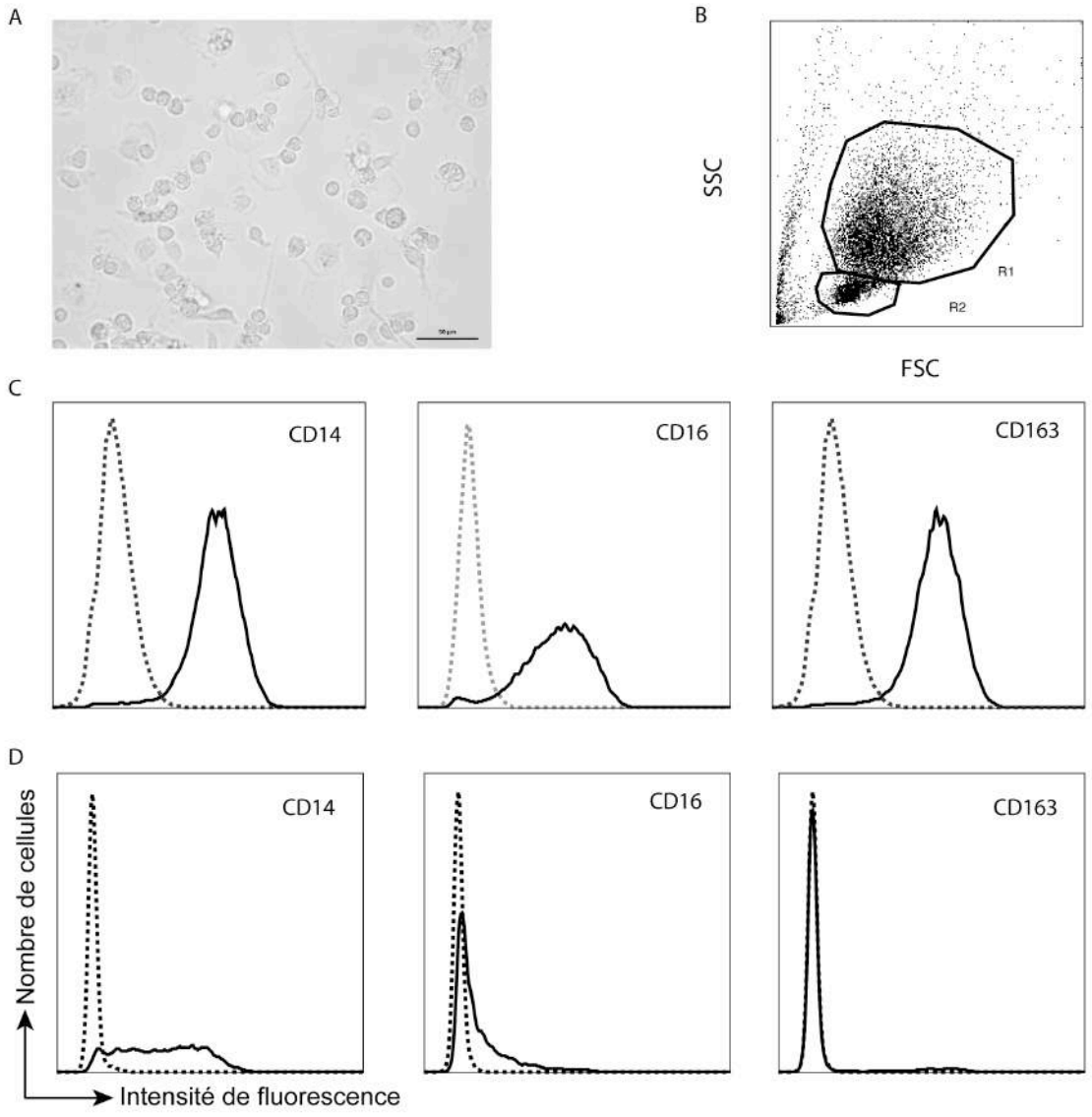


Figure 26- Morphologie et phénotype des BMM porcins. La morphologie des BMM a été observée sous microscopie en contraste de phase (A). Le phénotype des cellules a été analysé sur les 2 populations R1 et R2 identifiées sur des critères de taille et de granulométrie (FSC/SSC) (B). Profils de fluorescence du CD14, CD16 et CD163 des cellules en R1 (C) et R2 (D). Les lignes en pointillé représentent les contrôles isotypiques et les lignes pleines représentent les marquages. Données représentatives de 6 expériences indépendantes.

Deux populations différentes ont été identifiées en fonction de leur morphologie : les cellules $FSC^{lo}SSC^{lo}$ et les cellules $FSC^{med}SSC^{med}$ (Figure 26). Les cellules $FSC^{lo}SSC^{lo}$ n'expriment pas ou peu CD16 et CD163. Parmi ces cellules, les $CD14^{+}$ pourraient représenter des monocytes. Les cellules $FSC^{med}SSC^{med}$ représentent environ 70% de la population totale ; elles co-expriment CD14 (le co-récepteur du LPS), CD16 (un récepteur de faible affinité au fragment Fc des IgG) et CD163 (un récepteur « éboueur »). Ces 3 marqueurs ayant été décrits comme des marqueurs de la lignée monocyte/macrophage porcine, nous considérons la population R1 comme les macrophages dérivés de la moelle osseuse.

III-2- Les BMM porcins expriment les récepteurs adrénergiques

Parmi les 8 isoformes de récepteurs adrénergiques analysés, les BMM en expriment 6 ; il s'agit des récepteurs ADRα1 (isoformes ADRα1B et ADRα1D), ADRα2 (isoformes ADRα2A et ADRα2B), ADRβ2 et ADRβ3 (Figure 27). Les signaux les plus intenses sont obtenus pour les récepteurs ADRα2 et ADRβ2, premiers récepteurs décrits comme étant exprimés par les macrophages murins et humains.

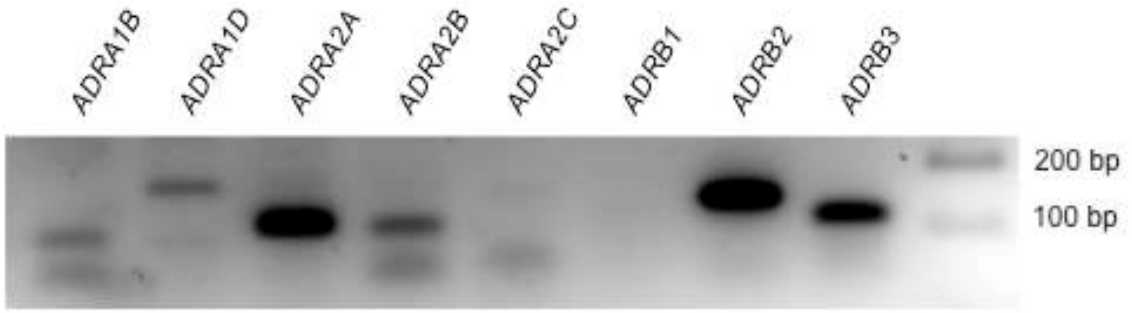


Figure 27- Expression des ARNm codant les récepteurs adrénergiques par les macrophages porcins. L'ARNm ACTB a été utilisé comme contrôle (non montré). Données représentatives de 3 expériences indépendantes.

Puisqu'ils expriment les récepteurs adrénergiques, nous avons ensuite analysé l'effet des catécholamines sur différentes fonctions des macrophages porcins.

III-3- Les agonistes β2-adrénergiques modulent les sécrétions de cytokines induites par le LPS

Dans un premier temps, nous avons analysé l'effet de l'Ad et de la NA sur les sécrétions de TNF-α, d'IL-8, d'IL-10, d'IL-6 et d'IL-12p40 induites par le LPS.

Les BMM non traités avec du LPS ne sécrètent pas ou peu les cytokines analysées excepté l'IL-8 (336 ± 203 pg/ml). Le LPS induit la sécrétion de TNF-α (1265 ± 188 pg/ml), d'IL-8 (35 ± 15ng/ml) et d'IL-10 (335 pg/ml ± 200 pg/ml) par les BMM porcins. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas détecté d'IL-12p40 ni d'IL-6.

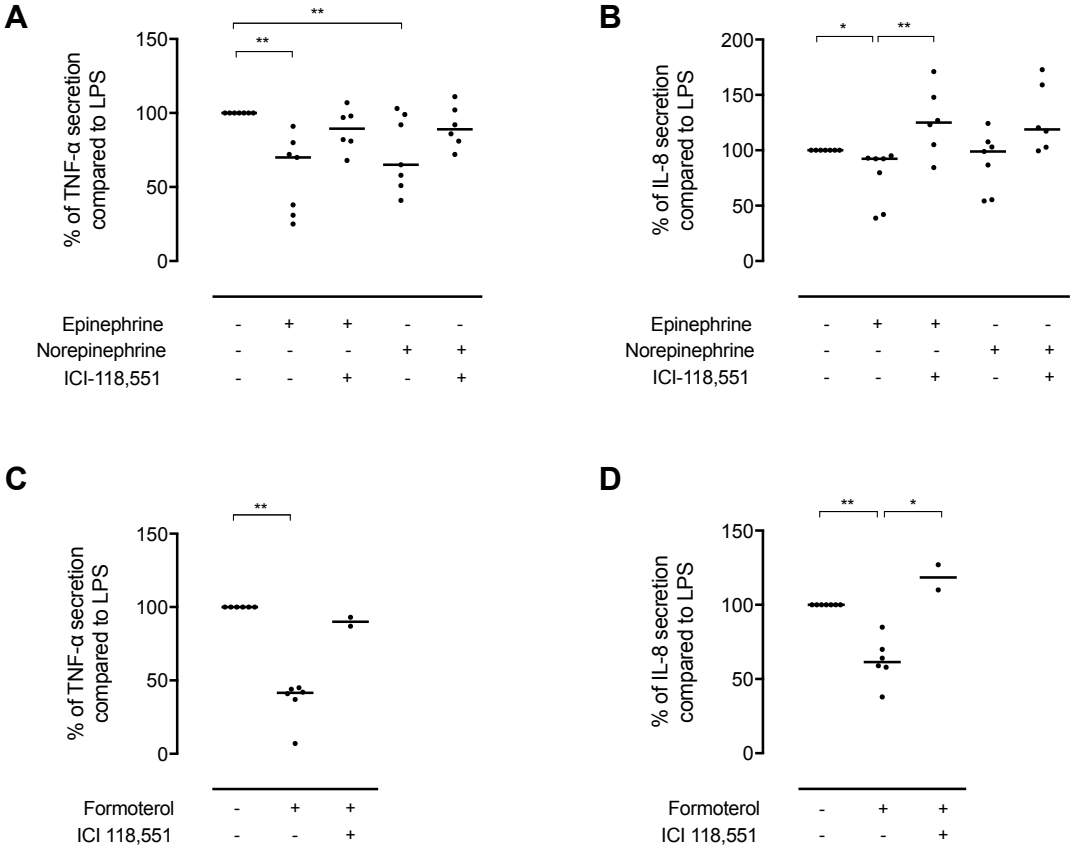


Figure 28- Effets de l'Ad et du formotérol sur les sécrétions de TNF-α et d'IL-8 induites par le LPS. Les BMM ont été traités pendant 24h avec du LPS (10 ng/ml) en présence ou en absence d'Ad (10^{-7} M), de NA (10^{-7} M) ou de formotérol (10^{-9} M) +/- ICI-118,551 (10^{-5} M). Les productions de TNF-α (A et C) et d'IL-8 (B et D) sont standardisées par rapport au traitement LPS seul. Chaque point représente la moyenne d'une expérience indépendante avec au moins 2 mesures. Le trait représente la médiane. Les analyses statistiques ont été réalisées avec un test de Kruskall-Wallis suivi d'un post-test de Dunn. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

Tour d'abord, les catécholamines ou une stimulation β2-adrénergique spécifique n'affectent pas la sécrétion d'IL-10 induite par le LPS (données non montrées). Au contraire,

l'Ad et, dans une moindre mesure la NA, diminuent la sécrétion de TNF-α induite par le LPS. Cette réduction de sécrétion n'est pas observée avec un antagoniste des récepteurs ADRβ2, l'ICI 118,551 (Figure 28A).

L'Ad, au contraire de la NA, modifie également la sécrétion d'IL-8 induite par le LPS et cet effet est empêché par l'ICI 118,551 (Figure 28B).

Le formotérol inhibe quant à lui les productions de TNF-α et d'IL-8 induites par le LPS. Cette inhibition est médiée par le récepteur ADRβ2 puisque prévenue par l'ajout d'ICI 118,551 (Figure 28C et D). Ainsi, l'activation des récepteurs ADRβ2 exprimés par les BMM porcins module la sécrétion de TNF-α et d'IL-8 induite par le LPS.

III-4- Les agonistes β2-adrénergiques n'affectent pas les activités antimicrobiennes des BMM porcins

Une des principales fonctions antimicrobiennes des macrophages est la phagocytose. L'effet des catécholamines et du formotérol sur la capacité phagocytaire des BMM porcins a été analysé par cytométrie de flux en utilisant des bactéries *E.coli* marquées à l'AF647 (Figure 29). Le traitement des cellules avec de l'Ad ou du formotérol en présence de LPS ne modifie pas la capacité de phagocytose des BMM par rapport à un traitement au LPS seul.

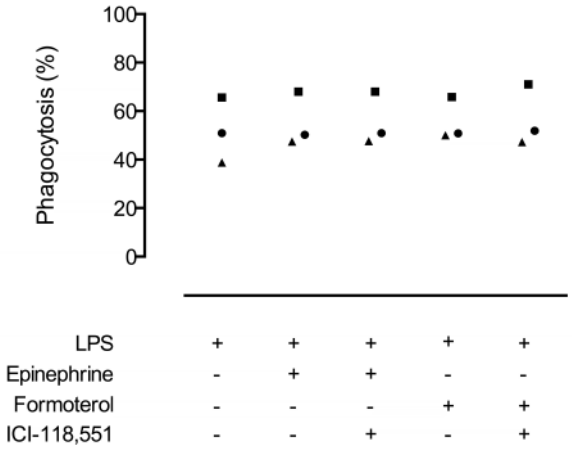


Figure 29- Analyse de la phagocytose par les BMM porcins. Les BMM ont été pré-traités pendant trois heures avec du LPS (10 ng/ml) en présence d'Ad (10^{-7} M) ou de formotérol (10^{-9} M) +/- ICI 118,551 (10^{-5} M) puis incubés avec les bactéries *E.coli* fluorescentes (4 bactéries pour 1 cellule) pendant 20 min à 37°C. Chaque symbole représente la moyenne du pourcentage de phagocytose d'un échantillon de macrophages. Les données présentées proviennent de trois différenciations indépendantes à partir de trois porcs différents.

L'acidification du phagosome est un des mécanismes adoptés par les macrophages pour détruire le pathogène phagocyté. L'analyse de l'acidification du phagosome a été effectuée sur des BMM traités au LPS en présence de formotérol pendant 3h puis incubés avec les bactéries *E.coli* co-marquées avec de l'AF647 (insensible au pH) et du FITC (sensible au pH) (Figure 30).

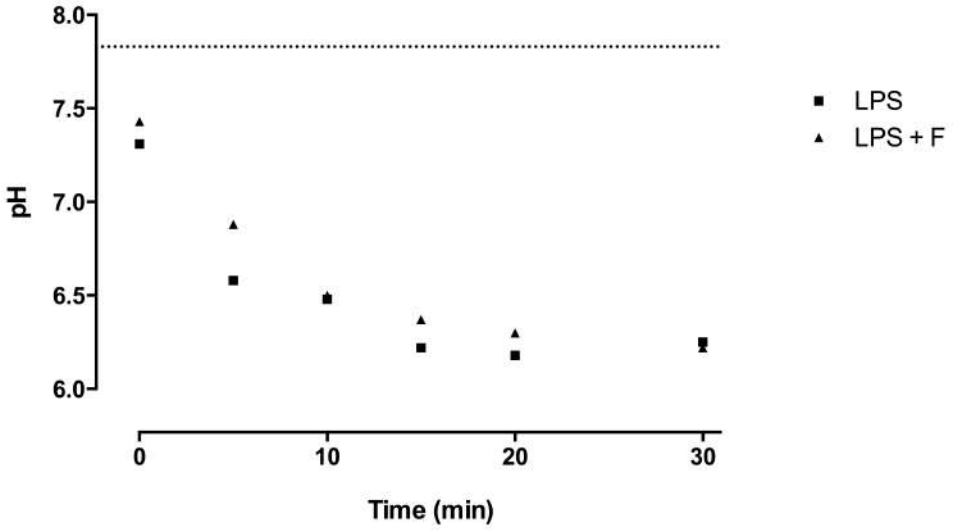


Figure 30- Cinétique d'acidification du phagosome des BMM porcins après phagocytose. Les BMM pré-traités pendant 3h avec du LPS (10 ng/ml) +/- formotérol (F, 10^{-9} M) ont été incubés pendant 15 min avec des bactéries *E.coli* doublement marquées. Pour chaque temps indiqué, le rapport entre les moyennes géométriques de l'AF647 et du FITC obtenues par cytométrie en flux, est reporté sur la courbe standard (Figure 24) pour obtenir le pH. Une expérience représentative de 3 est illustrée. La droite en pointillés représente le pH de cellules incubées à 4°C.

Après 15 min de phagocytose, le pH du phagosome est neutre (pH 7,3-7,4) puis il chute rapidement. Les courbes d'acidification ont une allure identique entre les BMM traités au LPS en absence ou en présence de formotérol. Comme pour la phagocytose, la stimulation du récepteur ADRβ2 n'affecte pas la cinétique d'acidification du phagosome dans les macrophages de porc.

Une troisième fonction antimicrobienne a été analysée : la production de métabolites de l'oxygène (ROS) en réponse à une stimulation par la PMA. Dans ces expériences, les BMM ont été pré-traités ou non pendant 18h avec du LPS en présence ou non de formotérol. La production de ROS après stimulation PMA a été analysée par chimioluminescence durant 2h (Figure 31A). Environ 30 min après l'ajout de PMA, on observe un pic de production de ROS

plus important pour les BMM traités au LPS. Pour comparer les différentes conditions expérimentales, les aires sous la courbe ont été calculées. Si le LPS augmente bien la production des ROS, son effet est identique en présence ou non de formotérol (Figure 31B).

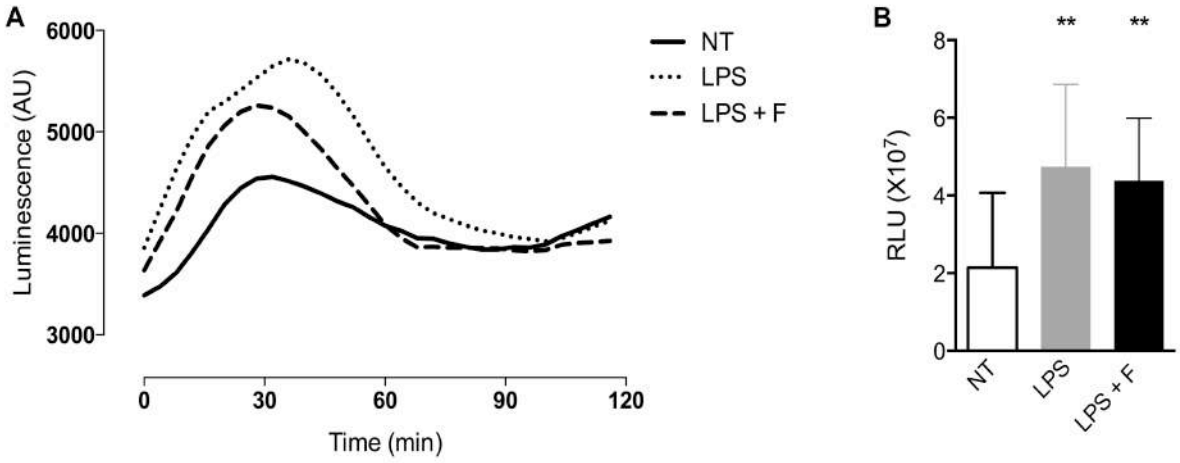


Figure 31- Cinétique de la production de ROS induite par le PMA par les BMM porcins. La production de ROS totale est analysée par chimioluminescence. Les BMM pré-traités avec du LPS (10 ng/ml) +/- formotérol (F, 10^{-9} M) pendant 18h ont été incubés avec du luminol et de l'HRP. La cinétique débute dès l'ajout de PMA (0,2 µM). Une expérience représentative de 5 expériences indépendantes est présentée, AU : unités arbitraires (A). Le graphique illustre les moyennes des aires sous la courbe de 5 expériences indépendantes +/- SD, RLU : unité relative de luminescence (B). Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant un test de Kruskall-Wallis suivi d'un post-test de Dunn.; ** $p<0,01$ par rapport au NT.

Ainsi, la stimulation β2-adrénergique des macrophages porcins n'affecte aucune des trois fonctions antimicrobiennes analysées.

III-5- Effets des agonistes β2-adrénergiques sur l'expression des molécules de SLAII DR

Les macrophages peuvent être aussi des cellules présentatrices d'antigènes. L'expression des molécules de SLA II DR a été analysée sur les BMM traités avec du LPS en présence d'Ad ou de formotérol +/- ICI 118,551 pendant 18h.

En absence de traitement, 70 à 90% des cellules $CD163^+$ expriment les antigènes SLAII DR selon les échantillons, et aucun des traitements n'affecte cette proportion de cellules (données non montrées). De façon intéressante, les traitements à l'Ad et au formotérol diminuent l'intensité de fluorescence obtenue après marquage des molécules de SLA II DR

(Figure 32). De plus, l'ICI 118,551 semble prévenir, au moins partiellement, la diminution d'expression des molécules de CMH de classe II induite par le formotérol et l'Ad.

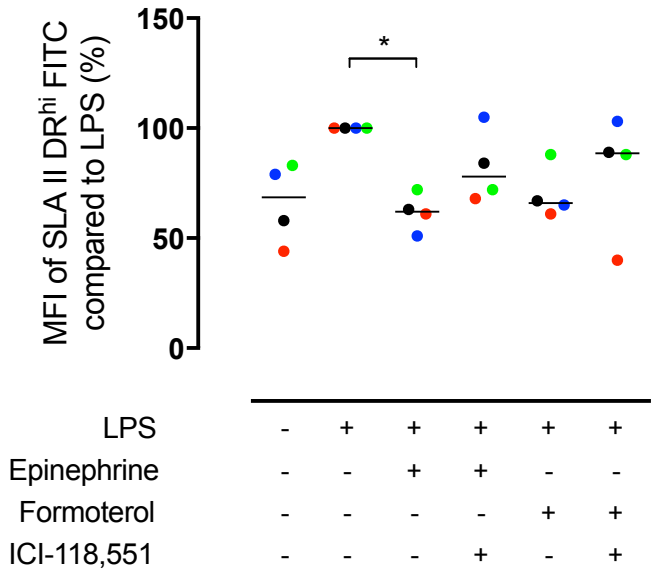


Figure 32- Expression des molécules de SLA II DR par les BMM porcins. Les BMM ont été pré-traités durant 18h avec du LPS (10 ng/ml) en présence d'Ad (10^{-7} M) ou de formotérol (10^{-9} M) +/- ICI 118,551 (10^{-5} M). Les moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) représentant le niveau d'expression des molécules de SLA II DR ont été analysées sur les cellules $CD163^{+}$. Chaque symbole correspond à la moyenne de duplicats d'un échantillon de macrophage. Les données présentées ont été obtenues à partir de BMM provenant de 4 différenciations indépendantes à partir de 4 porcs différents. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant un test de Kruskall-Wallis suivi d'un post-test de Dunn. * $p<0,05$

III-6- Le formotérol diminue l'expression des gènes CXCL13, IDO1, IL7R et CCL20 induite par le LPS

Chez l'homme, plusieurs études ont analysé les différences d'expression des ARNm de certains gènes entre des populations fonctionnellement opposées de macrophages. En se basant sur ces travaux, nous avons sélectionné certains gènes pour leur association à un phénotype donné : *IFR5, IDO1, CXCL13, IL7R* et *CCL20* comme marqueurs de M(LPS) et *MMP9, IRF4, CD206* et *PPARG* comme marqueurs de M(IL-4).

En absence de stimulation par le LPS, les transcrits de l'ensemble de ces gènes sont détectés dans les BMM porcins. Comme attendu, un traitement au LPS pendant 6h augmente de manière importante la quantité d'ARNm codant *IDO1, CXCL13, IL7R* et *CCL20*

(Figure 33). Etonnamment, pour le gène *IRF5*, nous n'avons pas retrouvé l'induction d'expression par le LPS décrite initialement chez l'homme (donnée non présentée).

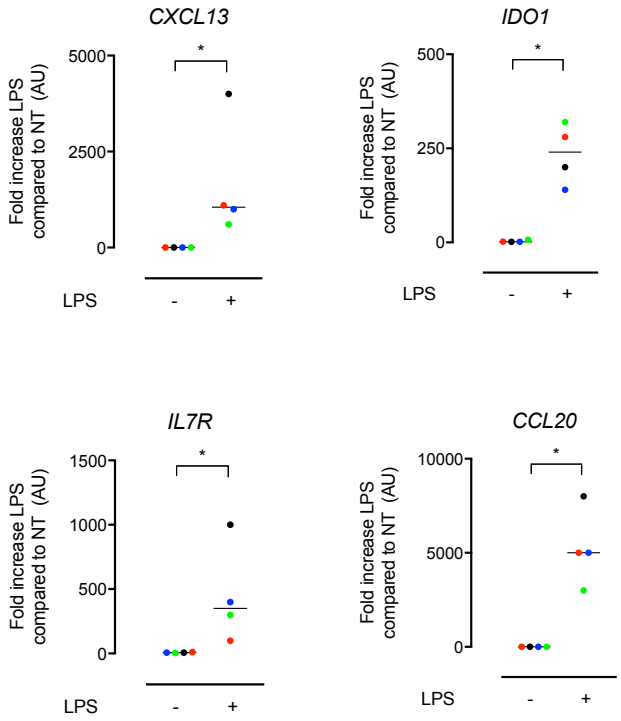


Figure 33- Expression des transcrits *CXCL13, IDO1, IL7R* et *CCL20* par les BMM porcins en réponse au LPS. NT, non traité ; AU, unités arbitraires. L'effet du LPS sur la quantité d'ARNm des gènes M(LPS) est analysé par la méthode $2^{(-\Delta Ct)}$ en utilisant la β-actine comme référence. Les données présentées proviennent de 4 différenciations indépendantes à partir de progéniteurs provenant de 4 porcs différents. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant un test de Mann-Whitney. * $p<0,05$

La figure 34 montre l'effet du formotérol, un agoniste ADRβ2, sur l'expression de ces 5 gènes considérés comme M(LPS) chez l'homme. Ainsi, le formotérol inhibe l'induction d'expression par le LPS des ARNm *CXCL13, IDO1, IL7R* et *CCL20* dans les macrophages dérivés de 4 porcs différents. Etonnamment, le formotérol augmente l'expression du transcrit *IRF5* dans les 4 préparations de macrophages par rapport au traitement LPS seul.

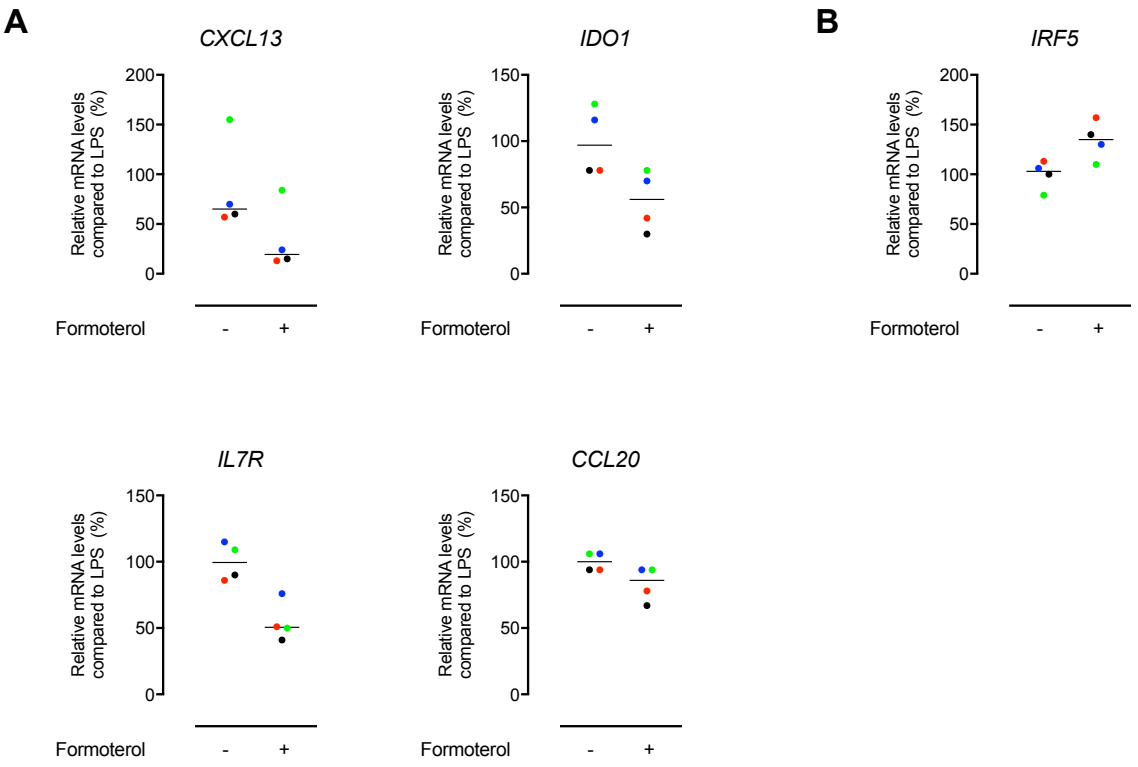


Figure 34- Effet du formotérol sur les quantités de transcrits induits par le LPS par les BMM porcins. Les BMM ont été traités pendant 6h avec du LPS (10 ng/ml) en présence ou non de formotérol (10^{-9} M). Pour chaque condition, les quantités relatives d'ARNm sont standardisées à la moyenne des quantités relatives en condition LPS (rapportée à 100). Chaque pastille de couleur différente représente la moyenne des duplicats de mesure d'échantillon provenant d'un porc.

Comme attendu, le traitement au LPS des BMM n'a pas d'effet sur le niveau d'expression des transcrits M(IL-4) choisis, à savoir *MMP9*, *IRF4*, *CD206* et *PPARγ* (résultats non présentés). Tel que présenté en figure 35, le traitement au formotérol des BMM est sans effet sur l'expression des transcrits *CD206*, *PPARγ* et *IRF4*. Au contraire, l'expression du transcrit *MMP9* augmente fortement suite à la stimulation β2-adrénergique des macrophages provenant de 4 porcs différents.

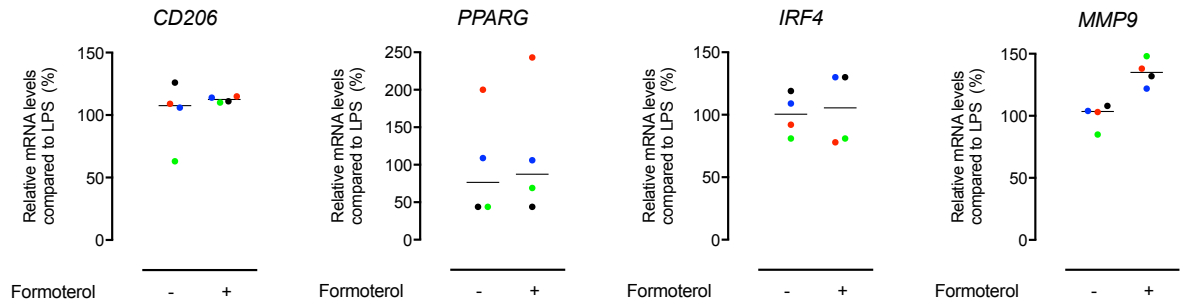


Figure 35- Effets du formotérol sur l'expression des transcrits M(IL-4) par les BMM porcins. Les BMM ont été traités pendant 6h avec du LPS (10 ng/ml) en présence ou non de formotérol (10^{-9} M). Pour chaque condition, les quantités relatives d'ARNm sont standardisées à la moyenne des quantités relatives en condition LPS (rapportée à 100). Chaque pastille de couleur différente représente la moyenne des duplicats de mesure d'échantillon provenant d'un porc.

Nous avons ensuite voulu regarder si tous ces effets étaient spécifiquement dépendants de la stimulation des récepteurs β2-adrénergiques par le formotérol (Figure 36). Pour cela nous avons étudié l'effet de l'ICI 118,551 sur la modulation par le formotérol du niveau d'expression des transcrits sélectionnés (Figure 36). Nous montrons que la diminution d'expression des transcrits *CXCL13, IDO1, IL7R* et *CCL20* est médiée spécifiquement par la stimulation du récepteur β2-adrénergique car elle est inhibée totalement (*CXCL13* et *CCL20*) ou partiellement (*IDO1* et *IL7R*) par l'ajout de l'antagoniste ICI 118,551. Concernant les transcrits *IRF5* et *MMP9*, l'augmentation d'expression des transcrits observée dans la première expérience n'a pas été reproduite dans cette expérience réalisée à partir de deux préparations indépendantes de BMM provenant de 2 porcs différents.

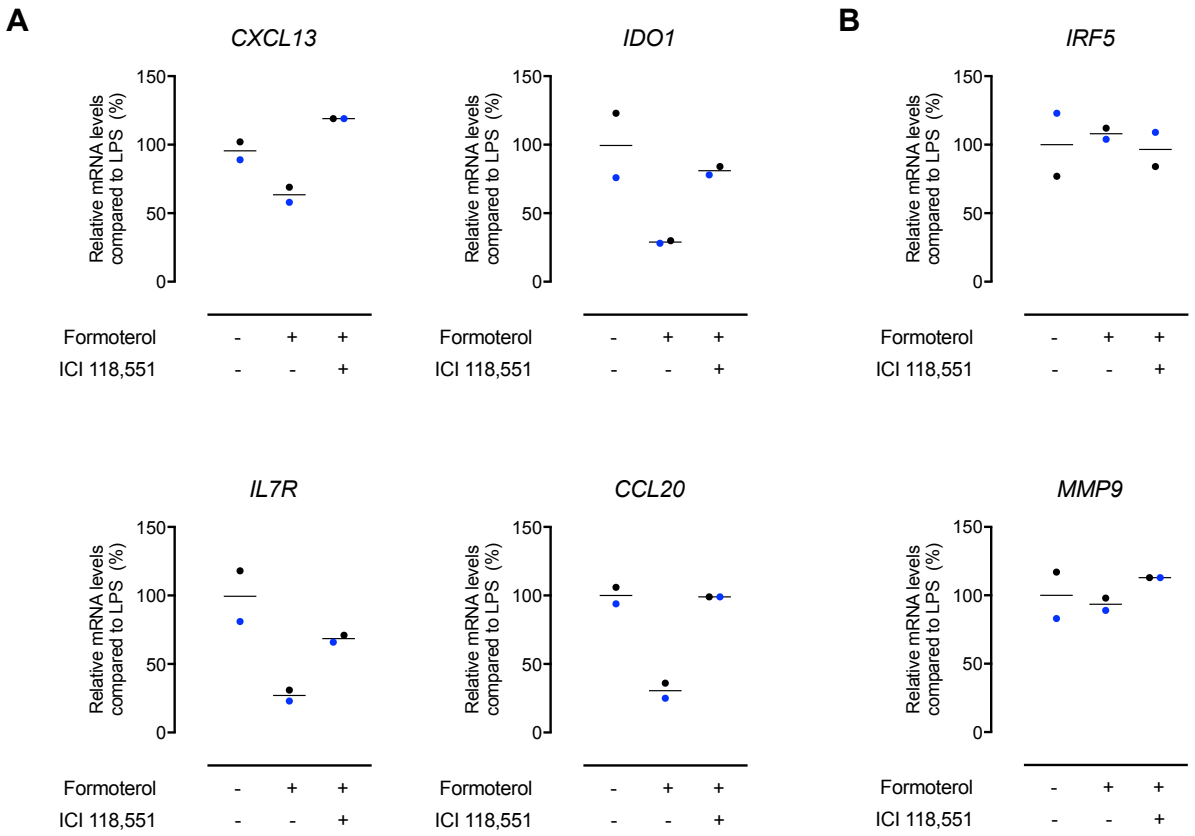


Figure 36- Effet du formotérol et de l'ICI 118,551 sur les quantités des transcrits induits par le LPS par les BMM porcins. Les BMM ont été traités pendant 6h avec du LPS (10 ng/ml) en présence de formotérol (10^{-9} M) +/- ICI 118,551 (10^{-5} M). Pour chaque condition, les quantités relatives d'ARNm sont standardisées à la moyenne des quantités relatives en condition LPS (rapportée à 100). Chaque pastille de couleur différente représente la moyenne des duplicats de mesure d'échantillon provenant d'un porc.

La réduction d'expression des transcrits *IDO1*, *CXCL13*, *IL7R* et *CCL20* par le formotérol est également observée après 18h de traitement (Figure 37). L'expression des transcrits *MMP9* et *IRF5* n'est pas modulée après 18h de traitement (résultat non présenté).

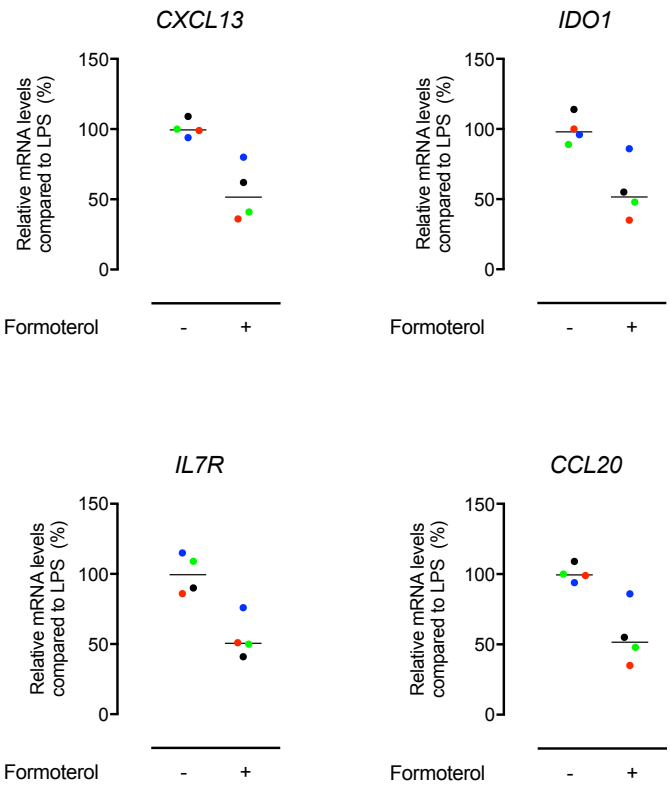


Figure 37- Effet du formotérol sur l'expression des transcrits induits par le LPS par les BMM porcins après 18h de traitement. Les BMM ont été traités pendant 18h avec du LPS (10 ng/ml) en présence de formotérol (10^{-9} M). Pour chaque condition, les quantités relatives d'ARNm sont standardisées à la moyenne des quantités relatives en condition LPS (rapportée à 100). Chaque pastille de couleur différente représente la moyenne des duplicats de mesure d'échantillon provenant d'un porc.

En conclusion, nous avons démontré que la stimulation β2-adrénergique des macrophages porcins inhibe l'augmentation d'expression des gènes induits par le LPS (*CXCL13*, *IDO1*, *IL7R* et *CCL20*), sans moduler l'expression des gènes non induits par le LPS (*IRF5, MMP9, IRF4, CD206*, et *PPARγ*).

	Adrénaline	Noradrénaline	Formotérol
Sécrétion de TNF-α	↓	↓	↓
Sécrétion d'IL-8	↓	=	↓
Sécrétion d'IL-10	=	=	=
Phagocytose	=	NA	=
Acidification du phagosome	NA	NA	=
Production de ROS	NA	NA	=
Expression des molécules du SLA II DR	↓	NA	=
Expression des transcrits *CXCL13* *CCL20* *IL7R* *IDO1*	NA	NA	↓
Expression des transcrits *IRF5* *MMP9* *IRF4* *PPARG* *CD206*	NA	NA	=

Tableau 3- Récapitulatif des résultats obtenus concernant les effets des catécholamines sur les fonctions des macrophages porcins en réponse au LPS. ↓ : diminution de la fonction analysée ; = pas d'effet sur la fonction analysée ; NA : effet non analysé.

Genes	Sequences		Size of PCR product
RT-PCR primers			
ADRA1B	Forward	5'-AACCAGACCTCGAGCAACTC-3'	90 bp
	Reverse	5'-AAAGAGGATGAAGGCACCCA-3'	
ADRA1D	Forward	5'-AAAGCCGCCCTACTCCTTC-3'	170 bp
	Reverse	5'-TAAGGACACAGCCTCCACCT-3'	
ADRA2A	Forward	5'-AGCTGGAATGGGACAGAGG-3'	113 bp
	Reverse	5'-AACACGGTGAACAGCATGAG-3'	
ADRA2B	Forward	5'- CTGGGGAGAAGGATGAAGGG-3'	106 bp
	Reverse	5'-ACACCTTCCTTCTGACCCTG-3'	
ADRA2C	Forward	5'-TGAGAGGTCAGAGGCACAGA-3'	59 bp
	Reverse	5'-TGGCTCCTTTCTCACCAACT-3'	
ADRB1	Forward	5'-AGCCCTGCAACCTGTCATC-3'	125 bp
	Reverse	5'-CAGCTGCACGGATCCCTC-3'	
ADRB2	Forward	5'-GAGGAGAAAGACAGCGAACG-3'	147 bp
	Reverse	5'-ATCATCGGGCACAGTACCTT-3'	
ADRB3	Forward	5'-GCTCATCATGGGAACCTTCACTCT-3'	119 bp
	Reverse	5'-CTAGCCAGTTAAGGGCGAGGAAAG-3'	
qRT-PCR primers			
IRF5	Forward	5'-TACGAGGTCTGCTCCAATGG-3'	68 bp
	Reverse	5'-GGCCCGAGACAGTAATCCTC-3'	
IRF4	Forward	5'-GGGACAGGAACCTTTTATG-3'	212 bp
	Reverse	5'-TGCTGGCATCGTAGGTGTG-3'	
MMP9	Forward	5'-TTATGGCTTCTGCCCTACCC-3'	216 bp
	Reverse	5'-AGGAACAGGCTGTAGCCTTG	
IDO1	Forward	5'-GGCACTTGATTGGTGGTCTC-3'	123 bp
	Reverse	5'-GCAATCCAAGCATCGTAAGG-3'	
CXCL13	Forward	5'-GGATCTCTGCTTCTCGTGCT-3'	122 bp
	Reverse	5'-ATAGGGACCCAGTTCGAGGT-3'	
CCL20	Forward	5'-GCTCCTGGCTGCTTTGATGTC-3'	146 bp
	Reverse	5'-CATTGGCGAGCTGCTGTGTG-3'	
CD206	Forward	5'-CCACAGTTACCCCCACCATA-3'	165 bp
	Reverse	5'-TAGACGCCAGATTTCCTCCA-3'	
IL7R	Forward	5'-CATTCTGGCCTGTGTGTTGTG-3'	64 bp
	Reverse	5'-ATCTGGGAGACTGGGCCATA-3'	
PPARG	Forward	5'-CCATTCCCGAGAGCTGATCC-3'	93 bp
	Reverse	5'-GGACACAGGCTCCACTTTGA-3'	
Reference gene primers			
ACTB	Forward	5'-ATCAAGATCATCGCGCCTCC-3'	160 bp
	Reverse	5'-CGCAGTCCGTCTAGAAGCAT-3'	
RPL19	Forward	5'-AACTCCCGTCAGCAGATCC-3'	147 bp
	Reverse	5'-AGTACCCTTCCGCTTACCG-3'	

Tableau 4- Séquences des amorces utilisées

IV- Discussion

L'analyse du phénotype des BMM après différenciation des progéniteurs hématopoiétiques en présence de rhM-CSF démontre que les BMM expriment des marqueurs de la lignée monocyte/macrophage de porc (Piriou-Guzylack and Salmon, 2008). En plus de l'expression de CD14 et de CD16, nous montrons que les BMM expriment fortement la molécule CD163 à la différence de ce que décrit Kapetanovic *et al.* qui utilisent des porcs adultes comme source de cellules hématopoiétiques (Kapetanovic et al., 2012). Si CD163 est peu exprimé par les monocytes porcins, il l'est, en revanche, fortement par les macrophages tissulaires (Sánchez et al., 1999). Chez l'homme, la différentiation des monocytes en macrophages en présence de M-CSF induit également l'expression de CD16 et CD163 (Ambarus et al., 2012).

Dans cette étude, nous montrons pour la première fois que les BMM porcins expriment les ARNm codant les récepteurs ADRα1 (isoformes ADRα1B et ADRα1D), ADRα2 (isoformes ADRα2A et ADRα2B), ADRβ2 et ADRβ3. Concernant les récepteurs ADRα2 et ADRβ2, ces résultats sont en accord avec les données obtenues chez les rongeurs et chez l'homme (Abrass et al., 1985; Liggett, 1989; Spengler et al., 1990). Les récepteurs ADRα1 et ADRβ3 sont aussi exprimés par les BMM. Si la présence des ARNm codant le récepteur ADRα1 a déjà été décrite dans les cellules macrophagiques de la microglie chez le rat, en revanche, à notre connaissance l'expression du récepteur ADRβ3 dans des cellules de la lignée macrophagique n'a jamais été rapportée (Mori et al., 2002). Le récepteur ADRβ1, pourtant décrit dans la lignée monocytaire humaine THP-1, n'est pas détecté dans nos expériences (Grisanti et al., 2010).

Si nous avons bien détecté l'expression des ARNm codant les récepteurs adrénergiques, celle-ci ne présage pas de l'expression de ces récepteurs au niveau protéique, même pour l'ADRα2, l'ADRβ2 et l'ADRβ3 qui semblent fortement exprimés. Dans notre étude, nous avons choisi de ne pas rechercher l'expression des récepteurs adrénergiques au niveau protéique mais de conforter les données obtenues en RT-PCR de manière indirecte en utilisant des agonistes et antagonistes de ces récepteurs. En effet, nous avons déjà éprouvé la mauvaise spécificité de plusieurs anticorps anti-ADRβ2 murins en utilisant des cellules isolées de souris ADRβ2$^{-/-}$ et les experts du domaine ont également rencontré des écueils avec les autres types de récepteurs adrénergiques.

Les catécholamines et le formotérol diminuent les sécrétions par les BMM de TNF-α et d'IL-8 induites par le LPS. Le traitement à l'Ad des BMM diminue leur sécrétion de TNF-α en réponse au LPS et cet effet est partiellement empêché par un antagoniste des ADRβ2. En accord avec ces données, le formotérol, un agoniste spécifique des récepteurs ADRβ2, induit également une baisse de la sécrétion de TNF-α induite par le LPS. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature obtenues chez la souris et montrant que l'Ad diminue la sécrétion de TNF-α induite par le LPS *via* l'activation du récepteur ADRβ2 (Deng et al., 2004; Grailer et al., 2014). Des résultats similaires ont été également obtenus avec des MDM humains, générés en présence de GM-CSF, et traités par le formotérol (Donnelly et al., 2010). En revanche, nous observons également un effet du formotérol sur la sécrétion d'IL-8 induite par le LPS au contraire de ces auteurs. La sécrétion d'IL-10 induite par le LPS n'est quant à elle pas modulée ni par les catécholamines ni par le formotérol. Nos résultats suggèrent que l'activation du ADRβ2 affecte plutôt l'activation des cellules inflammatoires sans pour autant induire un phénotype anti-inflammatoire.

Ensuite, nous avons analysé l'effet de l'Ad et du formotérol sur les fonctions antimicrobiennes des BMM. Ni l'Ad ni le formotérol ne modulent le pourcentage de phagocytose de bactéries *E. Coli* par les BMM porcins dans les conditions testées. Chez la souris, bien qu'hétérogènes, les différentes études montrent plutôt un effet stimulant de l'adrénaline, dépendant des récepteurs ADRβ. Par exemple, Zhou *et al*. ont démontré qu'un prétraitement à l'Ad 10^{-6} M augmente significativement la capacité de phagocytose des macrophages péritonéaux de rat, alors que de plus fortes concentrations n'ont pas d'effet (Zhou et al., 2014). L'Ad, comme l'isoprénaline, agoniste des récepteurs ADRβ, stimule également la phagocytose de BMM murins si le traitement est suffisamment long (>8h) (Muthu et al., 2010). De façon très intéressante, chez l'homme, Giordani *et al.* ont récemment montré qui ni l'Ad ni le clenbutérol, un agoniste des récepteurs ADRβ2, n'affecte la capacité des monocytes à phagocyter des microparticules fluorescentes (Giordani et al., 2015).

Dans les expériences suivantes, nous avons analysé les effets du formotérol sur l'acidification du phagosome et sur la production de ROS. Ces deux mécanismes mis en place par les macrophages participent à la destruction du pathogène, une fois internalisé (Levin et al., 2016). A ma connaissance, aucune étude à jour ne s'est intéressée à l'effet des agonistes β2-adrénergiques sur ces fonctions macrophagiques.

Chez l'homme, Canton *et al*. ont démontré que l'acidification du phagosome après phagocytose de zymosan diffère selon le phénotype des macrophages (Canton et al., 2014). Ainsi, le phagosome des macrophages dits M1, différenciés à partir de monocytes humains cultivés en présence de GM-CSF puis activés par l'IFN-γ et le LPS, reste neutre après la phagocytose de zymosan. Au contraire, le phagosome des macrophages dits M2, générés à partir des monocytes humains différenciés en présence de M-CSF et activés à l'IL-4, s'acidifie rapidement après la phagocytose du zymosan, ce qui se traduit par une diminution de pH d'environ 2,5 points. A l'inverse, la capacité des macrophages M1 à produire des ROS est plus importante que celle des macrophages M2, notamment du fait d'une plus forte expression des sous-unités $p91^{PHOX}$ et $p22^{PHOX}$ de la NADPH oxydase (Canton et al., 2014).

À la différence des travaux de Canton, les BMM porcins ont été générés en présence de M-CSF puis traités seulement avec du LPS. Dans ces conditions, nous montrons que les BMM porcins traités au LPS, comme les BMM murins (Yates et al., 2007), acidifient leur phagosome suite à la phagocytose. Dans nos expériences, le traitement au formotérol des macrophages porcins ne modifie pas l'acidification du phagosome. Néanmoins, la faible amplitude d'acidification du phagosome observée dans nos expériences (environ 1 point de pH) par rapport aux différents travaux dans la littérature (environ 2,5 points de pH) diminue la probabilité d'observer une différence entre nos différentes conditions de culture.

Ensuite, nous avons voulu analyser la production de ROS par les BMM porcins suite à la phagocytose de bactéries *E.coli*. La méthode de détection n'étant pas assez sensible pour visualiser une augmentation de la production de ROS intracellulaire, nous avons utilisé le PMA, connu pour être un activateur de la protéine kinase C qui active la NADPH oxydase. Dans nos expériences, si le traitement par le LPS des macrophages induit une augmentation de la production de ROS induite par le PMA, l'ajout de formotérol est sans effet. En accord avec nos résultats, Kuebler *et al.* ont montré que l'effet inhibiteur de la NA sur la production d'ions superoxydes par des macrophages humains est médié par les récepteurs ADRα (Kuebler et al., 2013).

Nous avons aussi étudié l'effet de l'Ad et du formotérol sur l'expression des molécules du SLA II DR permettant la présentation antigénique des antigènes du pathogène. Le LPS induit une augmentation de la quantité de molécules du SLA II DR sur les BMM porcins. L'Ad et le formotérol inhibent l'augmentation d'expression induite par le LPS des molécules du SLA II DR sur les BMM porcins. Nos résultats observés sont similaires à ceux déjà décrits dans la littérature chez la souris. L'Ad diminue le pourcentage de M(IFN-γ) exprimant les molécules

de CMH de classe II (Zwilling et al., 1993). Il en est de même pour les M(LPS) traités avec de la NA (Xiu et al., 2013). La stimulation du récepteur β2-adrénergique diminue les capacités de présentation antigénique des macrophages.

Enfin, nous avons étudié l'effet du formotérol sur l'expression d'un panel de gènes, décrits dans la littérature pour leur association à un phénotype donné chez l'homme (Murray et al., 2014) ou décrits chez le porc comme étant induits par le LPS (Kapetanovic et al., 2012). Dans nos expériences, comme attendu d'après les travaux de Kapetanovic *et al*., le LPS induit une augmentation de l'expression des ARNm codant *IDO1*, *CXCL13*, *CCL20* et *IL7R*. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits pour les macrophages dérivés de monocytes humains traités au LPS et à l'IFN-γ (Martinez et al., 2006).

Bien que *IRF5* ait été proposé comme marqueur des M(LPS) humains (Murray et al., 2014), la faible expression de *IRF5* et son absence d'induction par le LPS dans les BMM porcins n'est pas si étonnante. En effet, Krausgruber *et al.* ont montré que l'expression de *IRF5* dépend de la cytokine utilisée pour générer les macrophages humains ; les macrophages générés en présence de GM-CSF (appelés M1) expriment de plus grande quantité d'ARNm *IRF5* que ceux générés en présence de M-CSF (appelés M2) et répondent mieux à une stimulation par le LPS (Krausgruber et al., 2011). Deux autres études ont également démontré que l'expression du gène *IRF5* n'augmente pas dans les macrophages humains différenciés en M-CSF co-activés par l'IFN-γ et le LPS pendant 24h (Jaguin et al., 2013) ou par le LPS seulement après 6h (Sudan et al., 2015).

Concernant les transcrits *MMP9*, *IRF4*, *CD206* et *PPARG*, décrits comme marqueurs de cellules de type M2 (Lolmede et al., 2009), ils sont faiblement exprimés à l'état basal et ne semblent pas affectés par le traitement des cellules au LPS.

La stimulation β2-adrénergique des BMM par le formotérol diminue significativement l'expression des quatre gènes induits par le LPS: *IDO1*, *CXCL13*, *IL7R* et *CCL20*. L'enzyme IDO dégrade le tryptophane en kynurénine qui a une activité antimicrobienne (Murray et al., 1989) ; la stimulation de l'IL7R permet le recrutement des monocytes/macrophages au site inflammatoire (Li et al., 2012), quand CXCL13 permet le recrutement des LB (Legler et al., 1998) et CCL20 le recrutement des DC immatures et des cellules Th17 (Li et al., 2013). Enfin, l'expression des ARNm *MMP9*, *IRF4*, *CD206* et *PPARG* n'est pas affectée par le traitement au formotérol.

En conclusion, les BMM porcins générés à partir de progéniteurs hématopoïétiques en présence de rhM-CSF ressemblent aux macrophages décrits chez l'homme. Suite à une stimulation au LPS, les BMM porcins phagocytent des bactéries, acidifient leur phagosome, produisent des ROS et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires.

L'activation du récepteur ADRβ2 des BMM porcins traités au LPS diminue l'expression de gènes impliqués dans le recrutement de cellules immunitaires sur un site inflammatoire, diminue la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire et diminue l'expression des molécules du SLA II DR. Ainsi, le traitement au formotérol des BMM diminue certaines de leurs fonctions, et l'expression de gènes, pro-inflammatoires induites par le LPS. Concernant une possible transition vers un phénotype anti-inflammatoire, décrit chez la souris, nous n'avons pas observé d'effets des catécholamines sur la sécrétion d'IL-10 induite par le LPS. Nous n'avons pas non plus observé d'effets sur la quantité ARNm codant *IRF4, CD206, PPARγ* et *MMP9*. Cependant, d'après Jaguin *et al*. la quantité d'ARNm codant *IRF4* n'augmente pas dans des macrophages humains, générés avec du M-CSF à partir de monocytes, et activés avec de l'IL-4 (Jaguin et al., 2013). Par ailleurs, une deuxième étude a démontré que l'expression du HLA-DR diminue dans les macrophages de type M(IL-10) (Ambarus et al., 2012). Si l'ensemble de nos résultats démontre déjà que les catécholamines diminuent les fonctions pro-inflammatoires des macrophages porcins, des expériences complémentaires pourraient permettre d'affiner leur phénotype.

DISCUSSION GENERALE

Discussion générale

De nos jours, les porcs charcutiers proviennent à plus de 90% d'élevages intensifs. Les porcs y sont exposés à de nombreux agents stressants sociaux et environnementaux, tels que le surpeuplement, les variations de température, la castration, le mélange avec des porcs non familiers et le transport (Martínez-Miró et al., 2016). Ces agents stressants ont un impact sur la production porcine incluant les performances de croissance ainsi que la qualité de la carcasse. Par exemple, une augmentation de température d'environ 10°C, 12h par jour, comme une diminution de l'espace disponible par porc (0,3 m^2 en moins) pendant 35 jours diminuent les performances de croissance des porcs incluant le poids à l'abattage, le gain moyen quotidien ainsi que l'indice de consommation (White et al., 2008). De la même manière, les mélanges de porcs modifient leurs performances de production. Ainsi, deux mélanges successifs de porcs avec des congénères non familiers sur une période de 4 semaines diminuent le gain moyen quotidien. Dans cette étude, le comportement du porc a également été analysé. Les porcs mélangés visitent moins fréquemment les distributeurs alimentaires mais y passent plus de temps et prennent plus de nourriture (Hyun et al., 1998). Ainsi l'exposition aux agents stressants peut affecter les performances de production des porcs.

La période de sevrage est une période critique en élevage puisqu'elle correspond à l'exposition des porcelets à de multiples agents stressants (séparation de la mère, caudectomie, vaccination, mélange avec des congénères non familiers, changement d'environnement…). Cette période est propice à la survenue de désordres digestifs de type diarrhées, principalement causés par la bactérie *E.coli* entérotoxinogène (ETEC). Les pathologies digestives altèrent les performances des porcelets et peuvent même entraîner leur mort. Plusieurs études ont analysé l'impact des agents stressants sur les maladies digestives chez le porc. L'isolement d'un porcelet, la baisse de température dans la loge ou un mélange avec des congénères non familiers entraîne, chez les porcelets inoculés par voie orale, une augmentation de la présence de la bactérie ETEC dans les fèces (Jones et al., 2001). Un sevrage précoce des porcelets entraîne une diarrhée plus sévère et des perturbations de la barrière intestinale après une inoculation d'*E.coli* (McLamb et al., 2013). De plus, une étude a démontré qu'une augmentation de la température de la loge des porcs augmente la résistance des bactéries *E.coli* aux antibiotiques (Moro et al., 2000).

La bactérie *S. typhymurium* est un des principaux vecteurs de la salmonellose, maladie transmissible de l'animal à l'homme. Un mélange quotidien des porcs pendant 5 jours, comme un traitement à l'aide de glucocorticoïdes, augmente la présence de *S. typhymurium* dans les fèces par rapport aux porcs non mélangés (Callaway et al., 2006).

Ces données suggèrent que l'exposition aux agents stressants en élevage porcin augmenterait la prévalence des maladies infectieuses justifiant l'utilisation d'antibiotiques. L'élevage porcin représente un des plus gros consommateurs d'antibiotiques de la filière industrielle. Or, cette forte consommation d'antibiotiques est suspectée de favoriser la sélection de résistances bactériennes qui constituent un problème majeur de santé publique. En 2011, le plan national Ecoantibio a été lancé visant à réduire de 25% l'usage des antibiotiques en élevage. Dans ce contexte, il semble nécessaire d'identifier de nouvelles stratégies visant à augmenter la résistance des porcs face aux agents stressants et aux maladies infectieuses. Historiquement, les porcs ont été génétiquement sélectionnés essentiellement sur leurs performances de production, sans tenir compte de leur santé et de leur bien-être (Prunier et al., 2010). Une alternative proposée pour produire des porcs plus robustes (notamment plus résilients au stress) consiste à les sélectionner sur la force de leur axe HPA, c'est-à-dire sur leur capacité à sécréter du cortisol en réponse à une stimulation à l'ACTH (Mormède et al., 2011).

Dans ce contexte, le premier objectif de ma thèse était d'analyser l'effet d'un stress social aigu sur le système immunitaire de porcelets fortement et faiblement répondeurs à une stimulation à l'ACTH. Nous avons démontré qu'un stress social aigu augmente le nombre de granulocytes, de monocytes et de lymphocytes circulants que ce soit chez les porcelets HPA^{hi} ou HPA^{lo}. Ce phénomène de mobilisation leucocytaire, déjà très bien décrit chez les rongeurs (Dhabhar et al., 2012), est observé pour la première fois chez le porc. En effet, le nombre de leucocytes circulants n'est pas affecté suite à un transport (Hicks et al., 1998), à un isolement (Tuchscherer et al., 2009) ou à une combinaison de différents agents stressants durant 14 jours (Sutherland et al., 2006). Chez l'homme, un test TSST (Buske-Kirschbaum et al., 2007; Khanfer et al., 2010), comme une injection d'Ad (Burns et al., 1997), induit une démargination des leucocytes notamment des lymphocytes, des granulocytes et des monocytes. Chez les spationautes au retour d'une mission spatiale, le taux de NA est corrélé positivement avec le nombre de leucocytes circulants (Mills et al., 2001). Ainsi, dans notre étude, la mobilisation leucocytaire observée chez les porcelets stressés pourrait être médiée par les catécholamines et plus particulièrement par la NA.

L'effet d'un stress social aigu a aussi été analysé sur les différentes sous-populations de lymphocytes. Nous montrons une augmentation du nombre de LT $CD4^-CD8\alpha^+$ ainsi que du nombre de cellules NK et une diminution du nombre de LB et de cellules $CD4^+CD8\alpha^-$ chez l'ensemble des porcelets stressés. De la même manière, chez l'homme, suite à un test TSST, le nombre de cellules $CD8\alpha^+$ et NK augmente alors que le nombre de cellules $CD4^+$ et LB diminue (Marsland et al., 1997). Ainsi, un stress social aigu entraîne une augmentation rapide de la quantité de cellules cytotoxiques circulantes (les cellules NK et les LT $CD4^-CD8\alpha^+$) qui pourrait améliorer la défense de l'organisme face à un pathogène. De façon intéressante, chez l'homme, une injection d'Ad augmente spécifiquement le nombre de cellules T $CD8^+$ et de cellules NK par l'intermédiaire du récepteur ADRβ2 (Schedlowski et al., 1996). Ces résultats laissent penser que, chez le porc comme chez l'homme, les catécholamines seraient responsables de l'augmentation des cellules cytotoxiques circulantes en réponse à un stress aigu.

Les LT γδ représentent une sous-population importante de lymphocytes chez le porc (Hirt et al., 1990). Cette sous-population de lymphocytes n'a pas été analysée spécifiquement dans notre étude mais appartient à la population de cellules $CD4^-CD8^-CD21^-$ (pouvant représenter jusqu'à 50% de la population totale de lymphocytes). Chez l'homme, suite à un test TSST, une injection d'agoniste des récepteurs ADRβ ou une injection d'Ad, le nombre de LT γδ augmente tout comme celui des LT $CD8^+$ et des cellules NK (Anane et al., 2009; Dimitrov et al., 2010). Dans notre étude, l'augmentation des LT $CD8^+$ et de cellules NK observée suggère également une augmentation des LT γδ.

Nous avons ensuite analysé l'effet d'un mélange de porcelets sur les propriétés fonctionnelles des cellules sanguines comme la phagocytose ou la sécrétion *ex-vivo* de cytokines induite par le LPS ou par un mélange de PMA, d'ionomycine et de LPS. Dans notre étude, le mélange de porcelets entraîne une diminution des sécrétions d'IL-8 et de TNF-α induites par le LPS et une diminution de la capacité phagocytaire des cellules mononuclées chez les porcelets stressés des deux types. Chez l'homme, suite à un test TSST, la production de TNF-α déclenchée par le LPS diminue également dans une culture de sang total (Wirtz et al., 2007). L'ajout de dexamethasone dans une culture de sang total humain diminue les sécrétions de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-12, IL-6, IL-8 et TNF-α) en réponse au LPS (Visser et al., 1998; Horton and Remick, 2010). De la même manière, l'ajout d'Ad ou de NA dans une culture de sang total humain diminue les productions d'IL-6 et de TNF-α induites par le LPS (van der Poll et al., 1994; Strahler et al., 2015). Ces résultats suggèrent

que la diminution de production d'IL-8 et de TNF-α suite au mélange de porcelets serait médiée par l'ensemble des médiateurs du stress (GC et catécholamines).

L'effet d'un agent stressant sur l'activité phagocytaire des monocytes a été très peu étudié. Néanmoins, chez les spationautes 3h après l'atterrissage de la navette spatiale et jusqu'à 3 jours après, la capacité de phagocytose par les monocytes est plus faible par rapport à des personnes contrôles non impliquées dans des activités aérospatiales (Kaur et al., 2005).

Ainsi, à la différence de la plupart des données obtenues chez les rongeurs et des hypothèses formulées par Dhabhar, chez le porc, nous montrons que l'exposition aigüe à un agent stressant n'améliore pas mais diminue les fonctions immunitaires testées à un instant donné (Dhabhar et al., 2012). Néanmoins, une limite de ce travail est de ne nous être intéressées qu'aux conséquences immédiates d'un stress de mélange. De plus, les travaux suggérant une amélioration des fonctions immunitaires liée au stress ont analysé l'immunité locale, et non plasmatique, dans des modèles d'hypersensibilité retardée (Saint-Mezard et al., 2003; Viswanathan et al., 2005). Toutefois, de manière concordante avec nos résultats, une expérience de nage forcée diminue la quantité de TNF-α et d'IL-1β plasmatique après injection de LPS (Connor et al., 2005). À ce jour, il reste encore à déterminer le mécanisme par lequel un stress social aigu chez le porc diminue les réponses immunitaires des cellules immunitaires sanguines et à analyser l'impact de ce phénomène sur l'immunité anti-infectieuse.

Concernant la comparaison des paramètres immunitaires des porcelets HPA^{hi} et HPA^{lo}, seuls trois d'entre eux diffèrent : le nombre de LT $CD4^{+}CD8\alpha^{-}$, la sécrétion de TNF-α induite par le LPS et la sécrétion d'IL-8 induite par le mélange PIL. Ainsi, les porcelets HPA^{hi} possèdent un plus grand nombre de cellules $CD4^{+}CD8\alpha^{-}$ et une production plus importante de TNF-α induite par le LPS que les porcs HPA^{lo} indépendamment de l'exposition au stress. La production d'IL-8 induite par le mélange PIL est également accrue chez les porcs HPA^{hi}. Enfin, l'analyse globale des données en composantes principales montre un effet moindre du changement de loge sur les porcelets HPA^{hi}, suggérant que ceux-ci seraient plus résilients au stress que les porcelets HPA^{lo}. A l'avenir, il serait intéressant de comparer la sensibilité aux GC des porcelets HPA^{lo} et HPA^{hi}. En effet, la meilleure résilience au stress des porcs HPA^{hi} pourrait résulter de l'induction d'une résistance au cortisol tel que déjà démontré en conditions de stress chez l'homme (Rohleder, 2012) et le porc (Tuchscherer et al., 2010).

Si nos résultats sont encourageants, ils devront être confirmés sur les prochaines générations de porcs avant de déterminer si les variations observées pourraient conférer une résistance accrue aux agents pathogènes.

Les macrophages jouent un rôle important dans la défense contre un pathogène. Il a été montré que la multiplication de *S. typhymurium* est augmentée *in vitro* lorsque les macrophages alvéolaires sont traités avec du cortisol (Verbrugghe et al., 2011). De plus, il semble que l'environnement des macrophages, incluant leur exposition aux médiateurs du stress, pourrait moduler les réponses innées. Ainsi, le second objectif de ma thèse consistait à étudier plus spécifiquement l'effet des catécholamines sur les macrophages porcins.

Tandis que les marqueurs des différentes sous-populations de macrophages sont bien décrits chez la souris et l'homme, ce n'est pas le cas chez le porc (Martinez et al., 2008; Mosser and Edwards, 2008; Tugal et al., 2013; Murray et al., 2014). Récemment, Singleton *et al*. ont analysé les différences phénotypiques et fonctionnelles de 4 sous-populations de macrophages porcins générés à partir de monocytes en présence de rhM-CSF et stimulés par différents activateurs : l'IFN-γ et le LPS, l'IL-4, l'IL-10 ou la dexamethasone (Singleton et al., 2016). Quel que soit l'activateur, l'endocytose et la phagocytose sont identiques contrairement à l'expression des marqueurs membranaires qui est différente. Nous n'avons pas analysé le phénotype des BMM de manière aussi extensive que dans cette étude. Il faut noter que l'expression des molécules de SLA de classe II, de CD80/86 et de CD25 sont plus importantes dans les M(IFN-γ/LPS) que dans les M(IL-4). L'expression de CD163 est quant à elle augmentée dans les M(IL-10) et les M(dexamethasone). D'ailleurs, chez l'homme, le CD163 a été évoqué plutôt comme un marqueur de macrophage M2 (Gordon, 2003) même si les données varient d'un article à l'autre (Chen et al., 2015).

Nous montrons que la stimulation β2-adrénergique de macrophages porcins par l'Ad diminue la production de cytokines pro-inflammatoires induite par le LPS (TNF-α et IL-8), l'expression des molécules de SLA de classe II et également le niveau des transcrits des gènes induits par le LPS et impliqués dans le recrutement des cellules immunitaires au site inflammatoire. Ainsi, la stimulation β2-adrénergique des BMM porcins prévient l'acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire induit par le LPS, tel que déjà décrit chez la souris (Grailer et al., 2014). Néanmoins, dans l'étude de Grailer *et al.*, le traitement à l'Ad de BMM traités au LPS a également augmenté leur capacité à sécréter de l'IL-10 en réponse au LPS ainsi que le niveau d'expression des transcrits arginase-1. De façon intéressante, ces effets sont prévenus par l'ajout d'ICI 118,551. Ceci suggère que l'Ad, *via* la stimulation du récepteur β2-adrénergique, induit la différenciation des macrophages murins en macrophages régulateurs et ce, malgré la présence de LPS. Plus récemment, une autre étude a démontré que le traitement par un agoniste β-adrénergique de BMM murins, en absence de LPS, augmente l'expression

de gènes M(IL-4) et M(IL-10) et supprime l'expression de gènes M(IFN-γ) (Lamkin et al., 2016). Ces effets sont prévenus par un antagoniste des récepteurs ADRβ2. Ainsi, chez la souris, l'activation du récepteur ADRβ2 semble associée à une signature transcriptomique de macrophage M2.

Chez le porc, le phénotype des macrophages influence leur susceptibilité aux infections virales. La molécule CD163, connue pour être un récepteur d'entrée du virus responsable du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (PRRSV), est exprimée par les macrophages alvéolaires ainsi que par ceux du parenchyme pulmonaire (Calvert et al., 2007; Maisonnasse et al., 2016).

En comparant *in vitro* les effets de l'infection par le PRRSV de macrophages alvéolaires issus de différentes souches de porcs, Ait-Ali *et al.* ont observé qu'une accumulation de transcrits TNF-α et d'IL-8 dans les macrophages est associée à une moindre multiplication virale, suggérant un rôle clef de ces cytokines dans l'élimination du virus (Ait-Ali et al., 2007). D'autres études ont utilisé des MDM porcins pour analyser les effets d'une infection par le PRRSV dans ces cellules. Ainsi, Garcia-Nicolas *et al*. ont étudié la sensibilité de macrophages, différemment polarisés, à l'infection par différentes souches de PRRSV. Leurs résultats suggèrent une absence de corrélation entre l'expression de CD163 et la résistance à l'infection. En effet, les macrophages les plus sensibles à l'infection sont ceux traités à l'IL-4, qui présentent pourtant une expression moindre de CD163 (García-Nicolás et al., 2014). Dans une autre étude, en revanche, l'augmentation du pourcentage de macrophages exprimant CD163, induite par un traitement à l'IL-10 ou la dexaméthasone, s'accompagne d'une multiplication virale accrue dans les cellules (Singleton et al., 2016). Tout récemment, il a été également démontré l'intérêt des BMM porcins, générés en présence de M-CSF, pour l'étude de l'infection par le virus du PRRS (Chaudhuri et al., 2016). Dans ce contexte, nous pouvons nous demander si la stimulation β2-adrénergique des macrophages porcins pourrait moduler leur résistance à l'infection par le PRRSV.

Enfin, une autre piste intéressante restant à explorer est la production endogène de catécholamines par les macrophages porcins. En effet, celle-ci a été démontrée la première fois dans la lignée de macrophages murins RAW264.7. Un traitement au LPS pendant 48h augmente l'expression des ARNm codant la tyrosine hydroxylase et la production de NA intracellulaire et extracellulaire (Brown et al., 2003). Outre leur capacité à synthétiser des catécholamines, les macrophages peuvent les dégrader : un traitement de 4h au LPS augmente l'expression des ARNm codant l'enzyme MAO contribuant à la dégradation de la NA dans les macrophages alvéolaires murins (Flierl et al., 2007). Ainsi, les macrophages peuvent

réguler leur niveau de catécholamines endogène de manière autocrine. En retour, les catécholamines endogènes augmentent la production de cytokines induites par le LPS (Flierl et al., 2007). Les catécholamines endogènes modulent également la production de ROS en réponse au PMA (Dimitrijević et al., 2009). Ainsi, nous pouvons nous demander si la production de catécholamines endogènes par les macrophages, en réponse à une stimulation LPS, varie d'un individu à l'autre et si elle est corrélée à une meilleure résistance aux infections. Il serait notamment intéressant d'étudier cela dans des macrophages dérivés des porcs HPA^{hi} et HPA^{lo}.

En conclusion, l'ensemble des données obtenues pendant ma thèse apporte un éclairage nouveau vers une meilleure compréhension de la relation entre les agents stressants et l'immunité chez le porc.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

Abrass, C.K., O'Connor, S.W., Scarpace, P.J., and Abrass, I.B. (1985). Characterization of the beta-adrenergic receptor of the rat peritoneal macrophage. J. Immunol. *135*, 1338–1341.

Ader, R. (1974). Letter: Behaviorially conditioned immunosuppression. Psychosom. Med. *36*, 183–184.

Ader, R., and Cohen, N. (1975). Behaviorally conditioned immunosuppression. Psychosom. Med. *37*, 333–340.

Ader, R., and Cohen, N. (1982). Behaviorally conditioned immunosuppression and murine systemic lupus erythematosus. Science *215*, 1534–1536.

Ader, R., Cohen, N., and Felten, D. (1995). Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. The Lancet *345*, 99–103.

Afan, A.M., Broome, C.S., Nicholls, S.E., Whetton, A.D., and Miyan, J.A. (1997). Bone marrow innervation regulates cellular retention in the murine haemopoietic system. Br. J. Haematol. *98*, 569–577.

Aguilera, G. (1994). Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. Front. Neuroendocrinol. *15*, 321–350.

Ait-Ali, T., Wilson, A.D., Westcott, D.G., Clapperton, M., Waterfall, M., Mellencamp, M.A., Drew, T.W., Bishop, S.C., and Archibald, A.L. (2007). Innate immune responses to replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in isolated Swine alveolar macrophages. Viral Immunol. *20*, 105–118.

Almawi, W.Y., and Melemedjian, O.K. (2002). Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids. J. Mol. Endocrinol. *28*, 69–78.

Ambarus, C.A., Krausz, S., van Eijk, M., Hamann, J., Radstake, T.R.D.J., Reedquist, K.A., Tak, P.P., and Baeten, D.L.P. (2012). Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. J. Immunol. Methods *375*, 196–206.

Anane, L.H., Edwards, K.M., Burns, V.E., Drayson, M.T., Riddell, N.E., van Zanten, J.J.C.S.V., Wallace, G.R., Mills, P.J., and Bosch, J.A. (2009). Mobilization of gammadelta T lymphocytes in response to psychological stress, exercise, and beta-agonist infusion. Brain. Behav. Immun. *23*, 823–829.

Anderson, J.M., and Itallie, C.M.V. (2009). Physiology and Function of the Tight Junction. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *1*, a002584.

Austin, M.C., Rice, P.M., Mann, J.J., and Arango, V. (1995). Localization of corticotropin-releasing hormone in the human locus coeruleus and pedunculopontine tegmental nucleus: an immunocytochemical and in situ hybridization study. Neuroscience *64*, 713–727.

Babb, J.A., Masini, C.V., Day, H.E.W., and Campeau, S. (2013). Stressor-specific effects of sex on HPA axis hormones and activation of stress-related neurocircuitry. Stress Amst. Neth. *16*, 664–677.

Bailey, M., Christoforidou, Z., and Lewis, M.C. (2013). The evolutionary basis for differences between the immune systems of man, mouse, pig and ruminants. Vet. Immunol. Immunopathol. *152*, 13–19.

Bakdash, G., Sittig, S.P., van Dijk, T., Figdor, C.G., and de Vries, I.J.M. (2013). The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. Antigen Present. Cell Biol. *4*, 53.

Banks, W.A., and Erickson, M.A. (2010). The blood–brain barrier and immune function and dysfunction. Neurobiol. Dis. *37*, 26–32.

Banks, W.A., Kastin, A.J., and Broadwell, R.D. (1995). Passage of cytokines across the blood-brain barrier. Neuroimmunomodulation *2*, 241–248.

Barman, N.N., Bianchi, A.T., Zwart, R.J., Pabst, R., and Rothkötter, H.J. (1997). Jejunal and ileal Peyer's patches in pigs differ in their postnatal development. Anat. Embryol. (Berl.) *195*, 41–50.

Baschant, U., Frappart, L., Rauchhaus, U., Bruns, L., Reichardt, H.M., Kamradt, T., Bräuer, R., and Tuckermann, J.P. (2011). Glucocorticoid therapy of antigen-induced arthritis depends on the dimerized glucocorticoid receptor in T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 19317–19322.

Baune, B.T., Hohoff, C., Berger, K., Neumann, A., Mortensen, S., Roehrs, T., Deckert, J., Arolt, V., and Domschke, K. (2008). Association of the COMT val158met variant with antidepressant treatment response in major depression. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *33*, 924–932.

Bellinger, D.L., Felten, S.Y., and Felten, D.L. (1988). Maintenance of noradrenergic sympathetic innervation in the involuted thymus of the aged Fischer 344 rat. Brain. Behav. Immun. *2*, 133–150.

Benschop, R.J., Rodriguez-Feuerhahn, M., and Schedlowski, M. (1996). Catecholamine-Induced Leukocytosis: Early Observations, Current Research, and Future Directions. Brain. Behav. Immun. *10*, 77–91.

Berkenbosch, F., van Oers, J., del Rey, A., Tilders, F., and Besedovsky, H. (1987). Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. Science *238*, 524–526.

Bernardini, R., Kamilaris, T.C., Calogero, A.E., Johnson, E.O., Gomez, M.T., Gold, P.W., and Chrousos, G.P. (1990). Interactions between tumor necrosis factor-alpha, hypothalamic corticotropin-releasing hormone, and adrenocorticotropin secretion in the rat. Endocrinology *126*, 2876–2881.

Besedovsky, H., Rey, A. del, Sorkin, E., and Dinarello, C.A. (1986). Immunoregulatory feedback between

interleukin-1 and glucocorticoid hormones. Science *233*, 652–654.
Besedovsky, H.O., Rey, A. del, and Sorkin, E. (1981). Lymphokine-containing supernatants from con A-stimulated cells increase corticosterone blood levels. J. Immunol. *126*, 385–387.
Besedovsky, H.O., Del Rey, A., Klusman, I., Furukawa, H., Monge Arditi, G., and Kabiersch, A. (1991). Cytokines as modulators of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *40*, 613–618.
Bethin, K.E., Vogt, S.K., and Muglia, L.J. (2000). Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 9317–9322.
Binder, E.B., Salyakina, D., Lichtner, P., Wochnik, G.M., Ising, M., Pütz, B., Papiol, S., Seaman, S., Lucae, S., Kohli, M.A., et al. (2004). Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. Nat. Genet. *36*, 1319–1325.
Binns, R.M. (1982). Organisation of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig. Vet. Immunol. Immunopathol. *3*, 95–146.
Birkett, M.A. (2011). The Trier Social Stress Test Protocol for Inducing Psychological Stress. J. Vis. Exp. JoVE.
Bissette, G., Klimek, V., Pan, J., Stockmeier, C., and Ordway, G. (2003). Elevated Concentrations of CRF in the Locus Coeruleus of Depressed Subjects. Neuropsychopharmacology *28*, 1328–1335.
Bolhuis, J.E., Parmentier, H.K., Schouten, W.G.P., Schrama, J.W., and Wiegant, V.M. (2003). Effects of housing and individual coping characteristics on immune responses of pigs. Physiol. Behav. *79*, 289–296.
Borger, P., Hoekstra, Y., Esselink, M.T., Postma, D.S., Zaagsma, J., Vellenga, E., and Kauffman, H.F. (1998). Beta-adrenoceptor-mediated inhibition of IFN-gamma, IL-3, and GM-CSF mRNA accumulation in activated human T lymphocytes is solely mediated by the beta2-adrenoceptor subtype. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *19*, 400–407.
Bos, J.L., de Rooij, J., and Reedquist, K.A. (2001). Rap1 signalling: adhering to new models. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *2*, 369–377.
Bowers, S.L., Bilbo, S.D., Dhabhar, F.S., and Nelson, R.J. (2008). Stressor-Specific Alterations in Corticosterone and Immune Responses in Mice. Brain. Behav. Immun. *22*, 105–113.
Brown, A.S., Levine, J.D., and Green, P.G. (2008). Sexual dimorphism in the effect of sound stress on neutrophil function. J. Neuroimmunol. *205*, 25–31.
Brown, S.W., Meyers, R.T., Brennan, K.M., Rumble, J.M., Narasimhachari, N., Perozzi, E.F., Ryan, J.J., Stewart, J.K., and Fischer-Stenger, K. (2003). Catecholamines in a macrophage cell line. J. Neuroimmunol. *135*, 47–55.
Burns, A.M., Keogan, M., Donaldson, M., Brown, D.L., and Park, G.R. (1997). Effects of inotropes on human leucocyte numbers, neutrophil function and lymphocyte subtypes. Br. J. Anaesth. *78*, 530–535.
Buske-Kirschbaum, A., Kern, S., Ebrecht, M., and Hellhammer, D.H. (2007). Altered distribution of leukocyte subsets and cytokine production in response to acute psychosocial stress in patients with psoriasis vulgaris. Brain. Behav. Immun. *21*, 92–99.
Butler, J.E., Zhao, Y., Sinkora, M., Wertz, N., and Kacskovics, I. (2009). Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development. Dev. Comp. Immunol. *33*, 321–333.
Callaway, T.R., Morrow, J.L., Edrington, T.S., Genovese, K.J., Dowd, S., Carroll, J., Dailey, J.W., Harvey, R.B., Poole, T.L., Anderson, R.C., et al. (2006). Social stress increases fecal shedding of Salmonella typhimurium by early weaned piglets. Curr. Issues Intest. Microbiol. *7*, 65–71.
Calvert, J.G., Slade, D.E., Shields, S.L., Jolie, R., Mannan, R.M., Ankenbauer, R.G., and Welch, S.-K.W. (2007). CD163 Expression Confers Susceptibility to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses. J. Virol. *81*, 7371–7379.
Cannon, B. (1932). The wisdom of the body (New York, NY, US: W W Norton & Co).
Cannon, W. (1939). The wisdom of the body (New York: Norton).
Canton, J., Khezri, R., Glogauer, M., and Grinstein, S. (2014). Contrasting phagosome pH regulation and maturation in human M1 and M2 macrophages. Mol. Biol. Cell *25*, 3330–3341.
Chaudhuri, S., McKenna, N., Balce, D.R., and Yates, R.M. (2016). Infection of porcine bone marrow-derived macrophages by porcine respiratory and reproductive syndrome virus impairs phagosomal maturation. J. Gen. Virol. *97*, 669–679.
Chen, W. (2004). The late stage of T cell development within mouse thymus. Cell. Mol. Immunol. *1*, 3–11.
Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. Nat. Rev. Immunol. *13*, 227–242.
Chen, S., So, E.C., Strome, S.E., and Zhang, X. (2015). Impact of Detachment Methods on M2 Macrophage Phenotype and Function. J. Immunol. Methods *426*, 56–61.
Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G.F., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.-J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K., et al. (2007). High Resolution Crystal Structure of an Engineered Human β2-Adrenergic G protein-Coupled Receptor. Science *318*, 1258–1265.

Chillingworth, N.L., and Donaldson, L.F. (2003). Characterisation of a Freund's complete adjuvant-induced model of chronic arthritis in mice. J. Neurosci. Methods *128*, 45–52.
Choi, M.-K., Le, M.T., Nguyen, D.T., Choi, H., Kim, W., Kim, J.-H., Chun, J., Hyeon, J., Seo, K., and Park, C. (2012). Genome-level identification, gene expression, and comparative analysis of porcine ß-defensin genes. BMC Genet. *13*, 98.
Cohen, S., Janicki-Deverts, D., Doyle, W.J., Miller, G.E., Frank, E., Rabin, B.S., and Turner, R.B. (2012). Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 5995–5999.
Connor, T.J., Brewer, C., Kelly, J.P., and Harkin, A. (2005). Acute stress suppresses pro-inflammatory cytokines TNF-α and IL-1β independent of a catecholamine-driven increase in IL-10 production. J. Neuroimmunol. *159*, 119–128.
Cook, N.J., Schaefer, A.L., Lepage, P., and Jones, S.M. (1996). Salivary vs. serum cortisol for the assessment of adrenal activity in swine. Can. J. Anim. Sci. *76*, 329–335.
Couret, D., Prunier, A., Mounier, A.-M., Thomas, F., Oswald, I.P., and Merlot, E. (2009a). Comparative effects of a prenatal stress occurring during early or late gestation on pig immune response. Physiol. Behav. *98*, 498–504.
Couret, D., Jamin, A., Kuntz-Simon, G., Prunier, A., and Merlot, E. (2009b). Maternal stress during late gestation has moderate but long-lasting effects on the immune system of the piglets. Vet. Immunol. Immunopathol. *131*, 17–24.
Cuadrado, A., and Nebreda, A.R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. Biochem. J. *429*, 403–417.
Cunningham, E.T., and Sawchenko, P.E. (1988). Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. J. Comp. Neurol. *274*, 60–76.
Curtis, A.L., Pavcovich, L.A., Grigoriadis, D.E., and Valentino, R.J. (1995). Previous stress alters corticotropin-releasing factor neurotransmission in the locus coeruleus. Neuroscience *65*, 541–550.
Daaka, Y., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (1997). Switching of the coupling of the β2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. Nature *390*, 88–91.
Dalla, C., Antoniou, K., Drossopoulou, G., Xagoraris, M., Kokras, N., Sfikakis, A., and Papadopoulou-Daifoti, Z. (2005). Chronic mild stress impact: are females more vulnerable? Neuroscience *135*, 703–714.
Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., and Kelley, K.W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. Nat. Rev. Neurosci. *9*, 46–57.
Dayas, C. v., Buller, K. m., Crane, J. w., Xu, Y., and Day, T. a. (2001). Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. Eur. J. Neurosci. *14*, 1143–1152.
De Lorenzo, B.H.P., de Oliveira Marchioro, L., Greco, C.R., and Suchecki, D. (2015). Sleep-deprivation reduces NK cell number and function mediated by β-adrenergic signalling. Psychoneuroendocrinology *57*, 134–143.
De Rosa, S.C., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A., and Roederer, M. (2001). 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. Nat. Med. *7*, 245–248.
Dedovic, K., Renwick, R., Mahani, N.K., Engert, V., Lupien, S.J., and Pruessner, J.C. (2005). The Montreal Imaging Stress Task: using functional imaging to investigate the effects of perceiving and processing psychosocial stress in the human brain. J. Psychiatry Neurosci. JPN *30*, 319–325.
Deguchi, E., and Akuzawa, M. (1998). Effects of Fighting after Grouping on Plasma Cortisol Concentration and Lymphocyte Blastogenesis of Peripheral Blood Mononuclear Cells Induced by Mitogens in Piglets. J. Vet. Med. Sci. *60*, 149–153.
Deinzer, R., Kirschbaum, C., Gresele, C., and Hellhammer, D.H. (1997). Adrenocortical responses to repeated parachute jumping and subsequent h-CRH challenge in inexperienced healthy subjects. Physiol. Behav. *61*, 507–511.
Delahanty, D.L., Wang, T., Maravich, C., Forlenza, M., and Baum, A. (2000). Time-of-day effects on response of natural killer cells to acute stress in men and women. Health Psychol. Off. J. Div. Health Psychol. Am. Psychol. Assoc. *19*, 39–45.
Deng, J., Muthu, K., Gamelli, R., Shankar, R., and Jones, S.B. (2004). Adrenergic modulation of splenic macrophage cytokine release in polymicrobial sepsis. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *287*, C730-736.
Denner, J. (2008). Recombinant porcine endogenous retroviruses (PERV-A/C): a new risk for xenotransplantation? Arch. Virol. *153*, 1421.
Dhabhar, F.S., and McEwen, B.S. (1997). Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. Brain. Behav. Immun. *11*, 286–306.
Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S., and Spencer, R.L. (1995). Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. J. Immunol. *154*, 5511–5527.

Dhabhar, F.S., Malarkey, W.B., Neri, E., and McEwen, B.S. (2012). Stress-induced redistribution of immune cells—From barracks to boulevards to battlefields: A tale of three hormones – Curt Richter Award Winner. Psychoneuroendocrinology *37*, 1345–1368.

Dieu, M.-C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J.-M., Oldham, E., Aït-Yahia, S., Brière, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1998). Selective Recruitment of Immature and Mature Dendritic Cells by Distinct Chemokines Expressed in Different Anatomic Sites. J. Exp. Med. *188*, 373–386.

Dimitrijević, M., Pilipović, I., Stanojević, S., Mitić, K., Radojević, K., Pešić, V., and Leposavić, G. (2009). Chronic propranolol treatment affects expression of adrenoceptors on peritoneal macrophages and their ability to produce hydrogen peroxide and nitric oxide. J. Neuroimmunol. *211*, 56–65.

Dimitrov, S., Lange, T., and Born, J. (2010). Selective Mobilization of Cytotoxic Leukocytes by Epinephrine. J. Immunol. *184*, 503–511.

Diorio, D., Viau, V., and Meaney, M.J. (1993). The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *13*, 3839–3847.

Dokur, M., Boyadjieva, N., and Sarkar, D.K. (2004). Catecholaminergic control of NK cell cytolytic activity regulatory factors in the spleen. J. Neuroimmunol. *151*, 148–157.

Donnelly, L.E., Tudhope, S.J., Fenwick, P.S., and Barnes, P.J. (2010). Effects of formoterol and salmeterol on cytokine release from monocyte-derived macrophages. Eur. Respir. J. *36*, 178–186.

Dostert, A., and Heinzel, T. (2004). Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. Curr. Pharm. Des. *10*, 2807–2816.

Dowdell, K.C., Gienapp, I.E., Stuckman, S., Wardrop, R.M., and Whitacre, C.C. (1999). Neuroendocrine modulation of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis: a critical role for the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. J. Neuroimmunol. *100*, 243–251.

Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E.K., and Lanctôt, K.L. (2010). A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. Biol. Psychiatry *67*, 446–457.

Dunn, A.J., and Swiergiel, A.H. (2008). The role of corticotropin-releasing factor and noradrenaline in stress-related responses, and the inter-relationships between the two systems. Eur. J. Pharmacol. *583*, 186–193.

Durant, S., Coulaud, J., Amrani, A., el Hasnaoui, A., Dardenne, M., and Homo-Delarche, F. (1993). Effects of various environmental stress paradigms and adrenalectomy on the expression of autoimmune type 1 diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. J. Autoimmun. *6*, 735–751.

Dustin, M.L. (2014). The immunological synapse. Cancer Immunol. Res. *2*, 1023–1033.

Ebner, F., Rausch, S., Scharek-Tedin, L., Pieper, R., Burwinkel, M., Zentek, J., and Hartmann, S. (2014). A novel lineage transcription factor based analysis reveals differences in T helper cell subpopulation development in infected and intrauterine growth restricted (IUGR) piglets. Dev. Comp. Immunol. *46*, 333–340.

Edwards, K.M., Burns, V.E., Reynolds, T., Carroll, D., Drayson, M., and Ring, C. (2006). Acute stress exposure prior to influenza vaccination enhances antibody response in women. Brain. Behav. Immun. *20*, 159–168.

Ekkel, E., Vandoorn, C., Hessing, M., and Tielen, M. (1995). The Specific-Stress-Free Housing System Has Positive Effects on Productivity, Health, and Welfare of Pigs. J. Anim. Sci. *73*, 1544–1551.

Elenkov, I.J. (2004). Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1024*, 138–146.

Elizabeth Bolhuis, J., Schouten, W.G.P., Schrama, J.W., and Wiegant, V.M. (2005). Individual coping characteristics, aggressiveness and fighting strategies in pigs. Anim. Behav. *69*, 1085–1091.

Endo, Y., Yamauchi, K., Fueta, Y., and Irie, M. (2001). Changes of body temperature and plasma corticosterone level in rats during psychological stress induced by the communication box. Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res. *7*, 1161–1165.

Engler, H., Bailey, M.T., Engler, A., and Sheridan, J.F. (2004). Effects of repeated social stress on leukocyte distribution in bone marrow, peripheral blood and spleen. J. Neuroimmunol. *148*, 106–115.

Escribano, D., Soler, L., Gutiérrez, A.M., Martínez-Subiela, S., and Cerón, J.J. (2013). Measurement of chromogranin A in porcine saliva: validation of a time-resolved immunofluorometric assay and evaluation of its application as a marker of acute stress. Anim. Int. J. Anim. Biosci. *7*, 640–647.

Estrada, L.D., Ağaç, D., and Farrar, J.D. (2016). Sympathetic neural signaling via the β2-adrenergic receptor suppresses T-cell receptor-mediated human and mouse CD8(+) T-cell effector function. Eur. J. Immunol. *46*, 1948–1958.

Felten, D., Felten, S., Bellinger, D., Carlson, S., Ackerman, K., Madden, K., Olschowki, J., and Livnat, S. (1987). Noradrenergic Sympathetic Neural Interactions with the Immune-System - Structure and Function. Immunol. Rev. *100*, 225–260.

Felten, D.L., Livnat, S., Felten, S.Y., Carlson, S.L., Bellinger, D.L., and Yeh, P. (1984). Sympathetic innervation of lymph nodes in mice. Brain Res. Bull. *13*, 693–699.

Ferguson, S.S., Downey, W.E., Colapietro, A.M., Barak, L.S., Ménard, L., and Caron, M.G. (1996). Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. Science *271*,

363–366.
Fernandez, X., Meunier-Salaün, M.-C., and Mormede, P. (1994). Agonistic behavior, plasma stress hormones, and metabolites in response to dyadic encounters in domestic pigs: Interrelationships and effect of dominance status. Physiol. Behav. *56*, 841–847.
Flierl, M.A., Rittirsch, D., Nadeau, B.A., Chen, A.J., Sarma, J.V., Zetoune, F.S., McGuire, S.R., List, R.P., Day, D.E., Hoesel, L.M., et al. (2007). Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. Nature *449*, 721–725.
Flierl, M.A., Rittirsch, D., Huber-Lang, M., Sarma, J.V., and Ward, P.A. (2008). Catecholamines—Crafty Weapons in the Inflammatory Arsenal of Immune/Inflammatory Cells or Opening Pandora's Box? Mol. Med. *14*, 195–204.
Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 Coordinates the Primary Immune Response by Establishing Functional Microenvironments in Secondary Lymphoid Organs. Cell *99*, 23–33.
Franchimont, D. (2004). Overview of the Actions of Glucocorticoids on the Immune Response: A Good Model to Characterize New Pathways of Immunosuppression for New Treatment Strategies. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1024*, 124–137.
Frolkis, V.V. (1993). Stress-age syndrome. Mech. Ageing Dev. *69*, 93–107.
Fuentes, M., Tecles, F., Gutiérrez, A., Otal, J., Martínez-Subiela, S., and Cerón, J.J. (2011). Validation of an Automated Method for Salivary Alpha-Amylase Measurements in Pigs (Sus Scrofa Domesticus) and its Application as a Stress Biomarker. J. Vet. Diagn. Invest. *23*, 282–287.
García-Nicolás, O., Baumann, A., Vielle, N.J., Gómez-Laguna, J., Quereda, J.J., Pallarés, F.J., Ramis, G., Carrasco, L., and Summerfield, A. (2014). Virulence and genotype-associated infectivity of interferon-treated macrophages by porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. Virus Res. *179*, 204–211.
Gay, N.J., Symmons, M.F., Gangloff, M., and Bryant, C.E. (2014). Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. Nat. Rev. Immunol. *14*, 546–558.
Gerner, W., Talker, S.C., Koinig, H.C., Sedlak, C., Mair, K.H., and Saalmüller, A. (2015). Phenotypic and functional differentiation of porcine αβ T cells: Current knowledge and available tools. Mol. Immunol. *66*, 3–13.
Giordani, L., Cuzziol, N., Del Pinto, T., Sanchez, M., Maccari, S., Massimi, A., Pietraforte, D., and Viora, M. (2015). β2-Agonist clenbuterol hinders human monocyte differentiation into dendritic cells. Exp. Cell Res. *339*, 163–173.
Glaser, R., and Kiecolt-Glaser, J.K. (2005). Stress-induced immune dysfunction: implications for health. Nat. Rev. Immunol. *5*, 243–251.
Glaser, R., Sheridan, J., Malarkey, W.B., MacCallum, R.C., and Kiecolt-Glaser, J.K. (2000). Chronic stress modulates the immune response to a pneumococcal pneumonia vaccine. Psychosom. Med. *62*, 804–807.
Goebel, M.U., and Mills, P.J. (2000). Acute psychological stress and exercise and changes in peripheral leukocyte adhesion molecule expression and density. Psychosom. Med. *62*, 664–670.
Goehler, L.E., Gaykema, R.P., Nguyen, K.T., Lee, J.E., Tilders, F.J., Maier, S.F., and Watkins, L.R. (1999). Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *19*, 2799–2806.
Gomez-Sanchez, E., and Gomez-Sanchez, C.E. (2014). The multifaceted mineralocorticoid receptor. Compr. Physiol. *4*, 965–994.
Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. Nat. Rev. Immunol. *3*, 23–35.
Gordon, S. (2016). Phagocytosis: An Immunobiologic Process. Immunity *44*, 463–475.
Gosain, A., Muthu, K., Gamelli, R.L., and DiPietro, L.A. (2007). Norepinephrine suppresses wound macrophage phagocytic efficiency through alpha- and beta-adrenoreceptor dependent pathways. Surgery *142*, 170–179.
Gosain, A., Gamelli, R.L., and DiPietro, L.A. (2009). Norepinephrine-Mediated Suppression of Phagocytosis by Wound Neutrophils. J. Surg. Res. *152*, 311–318.
Grailer, J.J., Haggadone, M.D., Sarma, J.V., Zetoune, F.S., and Ward, P.A. (2014). Induction of M2 regulatory macrophages through the β2-adrenergic receptor with protection during endotoxemia and acute lung injury. J. Innate Immun. *6*, 607–618.
Granger, D.A., Kivlighan, K.T., El-SHEIKH, M., Gordis, E.B., and Stroud, L.R. (2007). Salivary α-Amylase in Biobehavioral Research. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1098*, 122–144.
Grebe, K.M., Hickman, H.D., Irvine, K.R., Takeda, K., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W. (2009). Sympathetic nervous system control of anti-influenza CD8+ T cell responses. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 5300–5305.
Gregersen, P.K., and Behrens, T.W. (2006). Genetics of autoimmune diseases — disorders of immune homeostasis. Nat. Rev. Genet. *7*, 917–928.
Griffin, A.C., Lo, W.D., Wolny, A.C., and Whitacre, C.C. (1993). Suppression of experimental autoimmune

encephalomyelitis by restraint stress: sex differences. J. Neuroimmunol. *44*, 103–116.
Grisanti, L.A., Evanson, J., Marchus, E., Jorissen, H., Woster, A.P., DeKrey, W., Sauter, E.R., Combs, C.K., and Porter, J.E. (2010). Pro-inflammatory responses in human monocytes are β1-adrenergic receptor subtype dependent. Mol. Immunol. *47*, 1244–1254.
Grisanti, L.A., Woster, A.P., Dahlman, J., Sauter, E.R., Combs, C.K., and Porter, J.E. (2011). α1-adrenergic receptors positively regulate Toll-like receptor cytokine production from human monocytes and macrophages. J. Pharmacol. Exp. Ther. *338*, 648–657.
Groenen, M.A.M., Archibald, A.L., Uenishi, H., Tuggle, C.K., Takeuchi, Y., Rothschild, M.F., Rogel-Gaillard, C., Park, C., Milan, D., Megens, H.-J., et al. (2012). Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. Nature *491*, 393–398.
de Groot, J., Ruis, M.A.W., Scholten, J.W., Koolhaas, J.M., and Boersma, W.J.A. (2001). Long-term effects of social stress on antiviral immunity in pigs. Physiol. Behav. *73*, 145–158.
Guereschi, M.G., Araujo, L.P., Maricato, J.T., Takenaka, M.C., Nascimento, V.M., Vivanco, B.C., Reis, V.O., Keller, A.C., Brum, P.C., and Basso, A.S. (2013). Beta2-adrenergic receptor signaling in CD4+Foxp3+ regulatory T cells enhances their suppressive function in a PKA-dependent manner. Eur. J. Immunol. *43*, 1001–1012.
den Haan, J.M.M., Arens, R., and van Zelm, M.C. (2014). The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. Immunol. Lett. *162*, 103–112.
Hall, B.M. (2015). T Cells: Soldiers and Spies—The Surveillance and Control of Effector T Cells by Regulatory T Cells. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN *10*, 2050–2064.
Handa, R.J., Mani, S.K., and Uht, R.M. (2012). ESTROGEN RECEPTORS AND THE REGULATION OF NEURAL STRESS RESPONSES. Neuroendocrinology *96*, 111–118.
Harbuz, M.S., Rees, R.G., and Lightman, S.L. (1993). HPA axis responses to acute stress and adrenalectomy during adjuvant-induced arthritis in the rat. Am. J. Physiol. *264*, R179-185.
Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., et al. (2013). Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. Immunity *38*, 792–804.
Hay, M., and Mormède, P. (1997). Determination of catecholamines and methoxycatecholamines excretion patterns in pig and rat urine by ion-exchange liquid chromatography with electrochemical detection. J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App. *703*, 15–23.
Herman, J.P., Ostrander, M.M., Mueller, N.K., and Figueiredo, H. (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry *29*, 1201–1213.
Herrlich, P. (2001). Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1. Oncogene *20*, 2465–2475.
Herrmann, M., Schölmerich, J., and Straub, R.H. (2000). STRESS AND RHEUMATIC DISEASES. Rheum. Dis. Clin. N. Am. *26*, 737–763.
Hervé, J., Dubreil, L., Tardif, V., Terme, M., Pogu, S., Anegon, I., Rozec, B., Gauthier, C., Bach, J.-M., and Blancou, P. (2013). β2-Adrenoreceptor Agonist Inhibits Antigen Cross-Presentation by Dendritic Cells. J. Immunol. *190*, 3163–3171.
Hessing, M.J., Scheepens, C.J., Schouten, W.G., Tielen, M.J., and Wiepkema, P.R. (1994). Social rank and disease susceptibility in pigs. Vet. Immunol. Immunopathol. *43*, 373–387.
Hicks, T.A., McGlone, J.J., Whisnant, C.S., Kattesh, H.G., and Norman, R.L. (1998). Behavioral, endocrine, immune, and performance measures for pigs exposed to acute stress. J. Anim. Sci. *76*, 474–483.
Hirt, W., Saalmüller, A., and Reddehase, M.J. (1990). Distinct γ/δ T cell receptors define two subsets of circulating porcine CD2−CD4−CD8− T lymphocytes*. Eur. J. Immunol. *20*, 265–269.
Horton, D.L., and Remick, D.G. (2010). Delayed Addition of Glucocorticoids Selectively Suppresses Cytokine Production in Stimulated Human Whole Blood. Clin. Vaccine Immunol. CVI *17*, 979–985.
Huang, J.-L., Zhang, Y.-L., Wang, C.-C., Zhou, J.-R., Ma, Q., Wang, X., Shen, X.-H., and Jiang, C.-L. (2012). Enhanced phosphorylation of MAPKs by NE promotes TNF-α production by macrophage through α adrenergic receptor. Inflammation *35*, 527–534.
Huizenga, N.A., Koper, J.W., De Lange, P., Pols, H.A., Stolk, R.P., Burger, H., Grobbee, D.E., Brinkmann, A.O., De Jong, F.H., and Lamberts, S.W. (1998). A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. J. Clin. Endocrinol. Metab. *83*, 144–151.
Hyun, Y., Ellis, M., and Johnson, R.W. (1998). Effects of feeder type, space allowance, and mixing on the growth performance and feed intake pattern of growing pigs. J. Anim. Sci. *76*, 2771–2778.
Ignacchiti, M.D.C., Sesti-Costa, R., Marchi, L.F., Chedraoui-Silva, S., and Mantovani, B. (2011). Effect of academic psychological stress in post-graduate students: the modulatory role of cortisol on superoxide release by neutrophils. Stress Amst. Neth. *14*, 290–300.
Jacobson, L., and Sapolsky, R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-

pituitary-adrenocortical axis. Endocr. Rev. *12*, 118–134.
Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O., and Lecureur, V. (2013). Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. Cell. Immunol. *281*, 51–61.
Jameson, S.C., and Masopust, D. (2009). Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches. Immunity *31*, 859–871.
Jetschmann, J.-U., Benschop, R.J., Jacobs, R., Kemper, A., Oberbeck, R., Schmidt, R.E., and Schedlowski, M. (1997). Expression and in-vivo modulation of α- and β-adrenoceptors on human natural killer (CD16+) cells. J. Neuroimmunol. *74*, 159–164.
Jiang, S., Li, X., Hess, N.J., Guan, Y., and Tapping, R.I. (2016). TLR10 Is a Negative Regulator of Both MyD88-Dependent and -Independent TLR Signaling. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *196*, 3834–3841.
Jiang, X.-H., Guo, S.-Y., Xu, S., Yin, Q.-Z., Ohshita, Y., Naitoh, M., Horibe, Y., and Hisamitsu, T. (2004). Sympathetic nervous system mediates cold stress-induced suppression of natural killer cytotoxicity in rats. Neurosci. Lett. *358*, 1–4.
Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. Nat. Rev. Immunol. *12*, 557–569.
Johnson, J.D., O'Connor, K.A., Deak, T., Stark, M., Watkins, L.R., and Maier, S.F. (2002). Prior Stressor Exposure Sensitizes LPS-Induced Cytokine Production. Brain. Behav. Immun. *16*, 461–476.
Johnson, J.D., Campisi, J., Sharkey, C.M., Kennedy, S.L., Nickerson, M., Greenwood, B.N., and Fleshner, M. (2005). Catecholamines mediate stress-induced increases in peripheral and central inflammatory cytokines. Neuroscience *135*, 1295–1307.
Johnson, R.W., von Borell, E.H., Anderson, L.L., Kojic, L.D., and Cunnick, J.E. (1994). Intracerebroventricular injection of corticotropin-releasing hormone in the pig: acute effects on behavior, adrenocorticotropin secretion, and immune suppression. Endocrinology *135*, 642–648.
JONES, P.H., ROE, J.M., and MILLER, B.G. (2001). Effects of stressors on immune parameters and on the faecal shedding of enterotoxigenic Escherichia coli in piglets following experimental inoculation. Res. Vet. Sci. *70*, 9–17.
Kachapati, K., Adams, D., Bednar, K., and Ridgway, W.M. (2012). The non-obese diabetic (NOD) mouse as a model of human type 1 diabetes. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *933*, 3–16.
Kanitz, E., Tuchscherer, M., Puppe, B., Tuchscherer, A., and Stabenow, B. (2004). Consequences of repeated early isolation in domestic piglets (Sus scrofa) on their behavioural, neuroendocrine, and immunological responses. Brain. Behav. Immun. *18*, 35–45.
Kapetanovic, R., Fairbairn, L., Beraldi, D., Sester, D.P., Archibald, A.L., Tuggle, C.K., and Hume, D.A. (2012). Pig Bone Marrow-Derived Macrophages Resemble Human Macrophages in Their Response to Bacterial Lipopolysaccharide. J. Immunol. *188*, 3382–3394.
Käser, T., Gerner, W., Hammer, S.E., Patzl, M., and Saalmüller, A. (2008). Detection of Foxp3 protein expression in porcine T lymphocytes. Vet. Immunol. Immunopathol. *125*, 92–101.
Katsuura, G., Arimura, A., Koves, K., and Gottschall, P.E. (1990). Involvement of organum vasculosum of lamina terminalis and preoptic area in interleukin 1 beta-induced ACTH release. Am. J. Physiol. *258*, E163-171.
Kaur, I., Simons, E.R., Castro, V.A., Ott, C.M., and Pierson, D.L. (2005). Changes in monocyte functions of astronauts. Brain. Behav. Immun. *19*, 547–554.
Khanfer, R., Phillips, A.C., Carroll, D., and Lord, J.M. (2010). Altered human neutrophil function in response to acute psychological stress. Psychosom. Med. *72*, 636–640.
Khanfer, R., Carroll, D., Lord, J.M., and Phillips, A.C. (2012). Reduced neutrophil superoxide production among healthy older adults in response to acute psychological stress. Int. J. Psychophysiol. *86*, 238–244.
Kim, B.-J., and Jones, H.P. (2010). Epinephrine-primed murine bone marrow-derived dendritic cells facilitate production of IL-17A and IL-4 but not IFN-γ by CD4+ T cells. Brain. Behav. Immun. *24*, 1126–1136.
King, C. (2009). New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. Nat. Rev. Immunol. *9*, 757–766.
Kiros, T.G., van Kessel, J., Babiuk, L.A., and 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.
Kirschbaum, C., Kudielka, B.M., Gaab, J., Schommer, N.C., and Hellhammer, D.H. (1999). Impact of gender, menstrual cycle phase, and oral contraceptives on the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. Psychosom. Med. *61*, 154–162.
Knap, P.W. (2005). Breeding robust pigs. Aust. J. Exp. Agric. *45*, 763.
Kobayashi, K.S., and van den Elsen, P.J. (2012). NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. Nat. Rev. Immunol. *12*, 813–820.
Kobayashi, S.D., and DeLeo, F.R. (2009). Towards a comprehensive understanding of the role of neutrophils in

innate immunity: a systems biology-level approach. Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med. *1*, 309–333.
Kobilka, B.K. (2011). Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology. Trends Pharmacol. Sci. *32*, 213–218.
Kohm, A.P., Mozaffarian, A., and Sanders, V.M. (2002). B Cell Receptor- and β2-Adrenergic Receptor-Induced Regulation of B7-2 (CD86) Expression in B Cells. J. Immunol. *168*, 6314–6322.
Kolmus, K., Tavernier, J., and Gerlo, S. (2015). β2-Adrenergic receptors in immunity and inflammation: Stressing NF-κB. Brain. Behav. Immun. *45*, 297–310.
Koolhaas, J.M., Korte, S.M., De Boer, S.F., Van Der Vegt, B.J., Van Reenen, C.G., Hopster, H., De Jong, I.C., Ruis, M.A.W., and Blokhuis, H.J. (1999). Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. Neurosci. Biobehav. Rev. *23*, 925–935.
Koolhaas, J.M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S.F., Flügge, G., Korte, S.M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., et al. (2011). Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. Neurosci. Biobehav. Rev. *35*, 1291–1301.
Koper, J.W., Stolk, R.P., de Lange, P., Huizenga, N.A., Molijn, G.J., Pols, H.A., Grobbee, D.E., Karl, M., de Jong, F.H., Brinkmann, A.O., et al. (1997). Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. Hum. Genet. *99*, 663–668.
Kostadinova, F., Schwaderer, J., Sebeo, V., and Brunner, T. (2014). Why does the gut synthesize glucocorticoids? Ann. Med. *46*, 490–497.
Kostrzewa, R.M., and Jacobowitz, D.M. (1974). Pharmacological Actions of 6-Hydroxydopamine. Pharmacol. Rev. *26*, 199–288.
Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., Hussell, T., Feldmann, M., and Udalova, I.A. (2011). IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. Nat. Immunol. *12*, 231–238.
Krukowski, K., Eddy, J., Kosik, K.L., Konley, T., Janusek, L.W., and Mathews, H.L. (2011). Glucocorticoid Dysregulation of Natural Killer Cell Function through Epigenetic Modification. Brain. Behav. Immun. *25*, 239–249.
Kubera, M., Basta-Kaim, A., Holan, V., Simbirtsev, A., Roman, A., Pigareva, N., Prokopieva, E., and Sham, J. (1998). Effect of mild chronic stress, as a model of depression, on the immunoreactivity of C57BL\6 mice. Int. J. Immunopharmacol. *20*, 781–789.
Kuebler, U., Wirtz, P.H., Sakai, M., Stemmer, A., and Ehlert, U. (2013). Acute stress reduces wound-induced activation of microbicidal potential of ex vivo isolated human monocyte-derived macrophages. PloS One *8*, e55875.
Kvetnansky, R., Sabban, E.L., and Palkovits, M. (2009). Catecholaminergic Systems in Stress: Structural and Molecular Genetic Approaches. Physiol. Rev. *89*, 535–606.
Lamkin, D.M., Sung, H.Y., Yang, G.S., David, J.M., Ma, J.C.Y., Cole, S.W., and Sloan, E.K. (2015). α2-adrenergic blockade mimics the enhancing effect of chronic stress on breast cancer progression. Psychoneuroendocrinology *51*, 262–270.
Lamkin, D.M., Ho, H.-Y., Ong, T.H., Kawanishi, C.K., Stoffers, V.L., Ahlawat, N., Ma, J.C.Y., Arevalo, J.M.G., Cole, S.W., and Sloan, E.K. (2016). β-Adrenergic-stimulated macrophages: Comprehensive localization in the M1-M2 spectrum. Brain. Behav. Immun. *57*, 338–346.
Langelaan, S., Bakker, A.B., Schaufeli, W.B., van Rhenen, W., and van Doornen, L.J.P. (2006). Do burned-out and work-engaged employees differ in the functioning of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? Scand. J. Work. Environ. Health *32*, 339–348.
Lassmann, H., and Ransohoff, R.M. (2004). The CD4-Th1 model for multiple sclerosis: a critical [correction of crucial] re-appraisal. Trends Immunol. *25*, 132–137.
Lawrence, T., and Natoli, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. Nat. Rev. Immunol. *11*, 750–761.
Leandro, C.G., de Lima, T.M., Alba-Loureiro, T.C., do Nascimento, E., Manhães de Castro, R., de Castro, C.M.M.B., Pithon-Curi, T.C., and Curi, R. (2007). Stress-induced downregulation of macrophage phagocytic function is attenuated by exercise training in rats. Neuroimmunomodulation *14*, 4–7.
LeBien, T.W., and Tedder, T.F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. Blood *112*, 1570–1580.
Lee, J., Choi, K., Olin, M.R., Cho, S.-N., and Molitor, T.W. (2004). γδ T Cells in Immunity Induced by Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin Vaccination. Infect. Immun. *72*, 1504–1511.
Legler, D.F., Loetscher, M., Roos, R.S., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Moser, B. (1998). B Cell–attracting Chemokine 1, a Human CXC Chemokine Expressed in Lymphoid Tissues, Selectively Attracts B Lymphocytes via BLR1/CXCR5. J. Exp. Med. *187*, 655–660.
Lehmann, S., Walther, T., Kempfert, J., Leontjev, S., Rastan, A., Falk, V., and Mohr, F.W. (2007). Stentless versus conventional xenograft aortic valve replacement: midterm results of a prospectively randomized trial. Ann. Thorac. Surg. *84*, 467–472.
Levin, R., Grinstein, S., and Canton, J. (2016). The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and

resolution. Immunol. Rev. *273*, 156–179.
Li, Q., Laumonnier, Y., Syrovets, T., and Simmet, T. (2013). Recruitment of CCR6-expressing Th17 cells by CCL20 secreted from plasmin-stimulated macrophages. Acta Biochim. Biophys. Sin. *45*, 593–600.
Li, R., Paul, A., Ko, K.W.S., Sheldon, M., Rich, B.E., Terashima, T., Dieker, C., Cormier, S., Li, L., Nour, E.A., et al. (2012). Interleukin-7 induces recruitment of monocytes/macrophages to endothelium. Eur. Heart J. *33*, 3114–3123.
Liggett, S.B. (1989). Identification and characterization of a homogeneous population of beta 2-adrenergic receptors on human alveolar macrophages. Am. Rev. Respir. Dis. *139*, 552–555.
Lillberg, K., Verkasalo, P.K., Kaprio, J., Teppo, L., Helenius, H., and Koskenvuo, M. (2003). Stressful life events and risk of breast cancer in 10,808 women: a cohort study. Am. J. Epidemiol. *157*, 415–423.
Liu, Y.-N., Peng, Y.-L., Lei-Liu, Wu, T.-Y., Zhang, Y., Lian, Y.-J., Yang, Y.-Y., Kelley, K.W., Jiang, C.-L., and Wang, Y.-X. (2015). TNFα mediates stress-induced depression by upregulating indoleamine 2,3-dioxygenase in a mouse model of unpredictable chronic mild stress. Eur. Cytokine Netw. *26*, 15–25.
Lolmede, K., Campana, L., Vezzoli, M., Bosurgi, L., Tonlorenzi, R., Clementi, E., Bianchi, M.E., Cossu, G., Manfredi, A.A., Brunelli, S., et al. (2009). Inflammatory and alternatively activated human macrophages attract vessel-associated stem cells, relying on separate HMGB1- and MMP-9-dependent pathways. J. Leukoc. Biol. *85*, 779–787.
Lunney, J.K., Ho, C.-S., Wysocki, M., and Smith, D.M. (2009). Molecular genetics of the swine major histocompatibility complex, the SLA complex. Dev. Comp. Immunol. *33*, 362–374.
Lupien, S.J., McEwen, B.S., Gunnar, M.R., and Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. Nat. Rev. Neurosci. *10*, 434–445.
Lutz, A.J., Li, P., Estrada, J.L., Sidner, R.A., Chihara, R.K., Downey, S.M., Burlak, C., Wang, Z.-Y., Reyes, L.M., Ivary, B., et al. (2013). Double knockout pigs deficient in N-glycolylneuraminic acid and Galactose α-1,3-Galactose reduce the humoral barrier to xenotransplantation. Xenotransplantation *20*, 27–35.
M Tsai, and O'Malley, and B.W. (1994). Molecular Mechanisms of Action of Steroid/Thyroid Receptor Superfamily Members. Annu. Rev. Biochem. *63*, 451–486.
Ma, L., and Pei, G. (2007). β-arrestin signaling and regulation of transcription. J. Cell Sci. *120*, 213–218.
Madden, K.S., Felten, S.Y., Felten, D.L., Hardy, C.A., and Livnat, S. (1994). Sympathetic nervous system modulation of the immune system. II. Induction of lymphocyte proliferation and migration in vivo by chemical sympathectomy. J. Neuroimmunol. *49*, 67–75.
Maestroni, G.J.M. (2000). Dendritic Cell Migration Controlled by α1b-Adrenergic Receptors. J. Immunol. *165*, 6743–6747.
Maestroni, G.J.M. (2002). Short exposure of maturing, bone marrow-derived dendritic cells to norepinephrine: impact on kinetics of cytokine production and Th development. J. Neuroimmunol. *129*, 106–114.
Magnon, C., Hall, S.J., Lin, J., Xue, X., Gerber, L., Freedland, S.J., and Frenette, P.S. (2013). Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. Science *341*, 1236361.
Maisonnasse, P., Bouguyon, E., Piton, G., Ezquerra, A., Urien, C., Deloizy, C., Bourge, M., Leplat, J.-J., Simon, G., Chevalier, C., et al. (2016). The respiratory DC/macrophage network at steady-state and upon influenza infection in the swine biomedical model. Mucosal Immunol. *9*, 835–849.
Malfait, A.-M., Malik, A.S., Marinova-Mutafchieva, L., Butler, D.M., Maini, R.N., and Feldmann, M. (1999). The β2-Adrenergic Agonist Salbutamol Is a Potent Suppressor of Established Collagen-Induced Arthritis: Mechanisms of Action. J. Immunol. *162*, 6278–6283.
Mandal, A., and Viswanathan, C. (2015). Natural killer cells: In health and disease. Hematol. Oncol. Stem Cell Ther. *8*, 47–55.
Manni, M., Granstein, R.D., and Maestroni, G. (2011). β2-Adrenergic agonists bias TLR-2 and NOD2 activated dendritic cells towards inducing an IL-17 immune response. Cytokine *55*, 380–386.
Mantegazza, A.R., Magalhaes, J.G., Amigorena, S., and Marks, M.S. (2013). Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. Traffic Cph. Den. *14*, 135–152.
Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol. *25*, 677–686.
Mark, A.L. (1996). The sympathetic nervous system in hypertension: a potential long-term regulator of arterial pressure. J. Hypertens. Suppl. Off. J. Int. Soc. Hypertens. *14*, S159-165.
Marsland, A.L., Herbert, T.B., Muldoon, M.F., Bachen, E.A., Patterson, S., Cohen, S., Rabin, B., and Manuck, S.B. (1997). Lymphocyte subset redistribution during acute laboratory stress in young adults: mediating effects of hemoconcentration. Health Psychol. Off. J. Div. Health Psychol. Am. Psychol. Assoc. *16*, 341–348.
Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000Prime Rep. *6*.
Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., and Mantovani, A. (2006). Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene

Expression. J. Immunol. *177*, 7303–7311.
Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., and Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. Front. Biosci. J. Virtual Libr. *13*, 453–461.
Martínez-Miró, S., Tecles, F., Ramón, M., Escribano, D., Hernández, F., Madrid, J., Orengo, J., Martínez-Subiela, S., Manteca, X., and Cerón, J.J. (2016). Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: an update. BMC Vet. Res. *12*.
Mason, J.W. (1971). A re-evaluation of the concept of "non-specificity" in stress theory. J. Psychiatr. Res. *8*, 323–333.
Mayr, B., and Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *2*, 599–609.
McEWEN, B.S. (1998). Stress, Adaptation, and Disease: Allostasis and Allostatic Load. Ann. N. Y. Acad. Sci. *840*, 33–44.
McEwen, B.S. (2000). Allostasis and Allostatic Load: Implications for Neuropsychopharmacology. Neuropsychopharmacology *22*, 108–124.
McEwen, B.S. (2007). Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. Physiol. Rev. *87*, 873–904.
McEwen, B.S., and Gianaros, P.J. (2010). Central role of the brain in stress and adaptation: links to socioeconomic status, health, and disease. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1186*, 190–222.
McGlone, J.J. (1985). A quantitative ethogram of aggressive and submissive behaviors in recently regrouped pigs. J. Anim. Sci. *61*, 559–565.
McGlone, J.J., Salak, J.L., Lumpkin, E.A., Nicholson, R.I., Gibson, M., and Norman, R.L. (1993). Shipping stress and social status effects on pig performance, plasma cortisol, natural killer cell activity, and leukocyte numbers. J. Anim. Sci. *71*, 888–896.
McLamb, B.L., Gibson, A.J., Overman, E.L., Stahl, C., and Moeser, A.J. (2013). Early Weaning Stress in Pigs Impairs Innate Mucosal Immune Responses to Enterotoxigenic E. coli Challenge and Exacerbates Intestinal Injury and Clinical Disease. PLoS ONE *8*.
Meisel, C., Schwab, J.M., Prass, K., Meisel, A., and Dirnagl, U. (2005). Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. Nat. Rev. Neurosci. *6*, 775–786.
Melchers, F. (2015). Checkpoints that control B cell development. J. Clin. Invest. *125*, 2203–2210.
Merlot, E., Mounier, A.M., and Prunier, A. (2011). Endocrine response of gilts to various common stressors: a comparison of indicators and methods of analysis. Physiol. Behav. *102*, 259–265.
Millán, S., González-Quijano, M.I., Giordano, M., Soto, L., Martín, A.I., and López-Calderón, A. (1996). Short and long restraint differentially affect humoral and cellular immune functions. Life Sci. *59*, 1431–1442.
Mills, P.J., Meck, J.V., Waters, W.W., D'Aunno, D., and Ziegler, M.G. (2001). Peripheral leukocyte subpopulations and catecholamine levels in astronauts as a function of mission duration. Psychosom. Med. *63*, 886–890.
Miossec, P., Korn, T., and Kuchroo, V.K. (2009). Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells. N. Engl. J. Med. *361*, 888–898.
Moffat, F.L., Han, T., Li, Z.M., Peck, M.D., Falk, R.E., Spalding, P.B., Jy, W., Ahn, Y.S., Chu, A.J., and Bourguignon, L.Y. (1996). Involvement of CD44 and the cytoskeletal linker protein ankyrin in human neutrophil bacterial phagocytosis. J. Cell. Physiol. *168*, 638–647.
Moisiadis, V.G., and Matthews, S.G. (2014). Glucocorticoids and fetal programming part 1: outcomes. Nat. Rev. Endocrinol. *10*, 391–402.
Molinoff, P.B. (1984). Alpha- and beta-adrenergic receptor subtypes properties, distribution and regulation. Drugs *28 Suppl 2*, 1–15.
Mommersteeg, P.M.C., Heijnen, C.J., Verbraak, M.J.P.M., and van Doornen, L.J.P. (2006). Clinical burnout is not reflected in the cortisol awakening response, the day-curve or the response to a low-dose dexamethasone suppression test. Psychoneuroendocrinology *31*, 216–225.
Mori, K., Ozaki, E., Zhang, B., Yang, L., Yokoyama, A., Takeda, I., Maeda, N., Sakanaka, M., and Tanaka, J. (2002). Effects of norepinephrine on rat cultured microglial cells that express α1, α2, β1 and β2 adrenergic receptors. Neuropharmacology *43*, 1026–1034.
Mormède, P., Foury, A., Terenina, E., and Knap, P.W. (2011). Breeding for robustness: the role of cortisol. Animal *5*, 651–657.
Moro, M. h., Beran, G. w., Griffith, R. w., and Hoffman, L. j. (2000). Effects of heat stress on the antimicrobial drug resistance of Escherichia coli of the intestinal flora of swine. J. Appl. Microbiol. *88*, 836–844.
Morozov, V.A., Wynyard, S., Matsumoto, S., Abalovich, A., Denner, J., and Elliott, R. (2017). No PERV transmission during a clinical trial of pig islet cell transplantation. Virus Res. *227*, 34–40.
Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat. Rev. Immunol. *8*, 958–969.
Munder, M., Eichmann, K., and Modolell, M. (1998). Alternative Metabolic States in Murine Macrophages

Reflected by the Nitric Oxide Synthase/Arginase Balance: Competitive Regulation by CD4+ T Cells Correlates with Th1/Th2 Phenotype. J. Immunol. *160*, 5347–5354.

Muneta, Y., Uenishi, H., Kikuma, R., Yoshihara, K., Shimoji, Y., Yamamoto, R., Hamashima, N., Yokomizo, Y., and Mori, Y. (2003). Porcine TLR2 and TLR6: Identification and Their Involvement in Mycoplasma hyopneumoniae Infection. J. Interferon Cytokine Res. *23*, 583–590.

Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. J. Leukoc. Biol. *89*, 557–563.

Murray, H.W., Szuro-Sudol, A., Wellner, D., Oca, M.J., Granger, A.M., Libby, D.M., Rothermel, C.D., and Rubin, B.Y. (1989). Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages. Infect. Immun. *57*, 845–849.

Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., et al. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity *41*, 14–20.

Musgrave, I.F., and Seifert, R. (1994). Human neutrophils and HL-60 cells do not possess α2-adrenoceptors. Biochem. Pharmacol. *47*, 233–239.

Muthu, K., Deng, J., Gamelli, R., Shankar, R., and Jones, S.B. (2005). Adrenergic modulation of cytokine release in bone marrow progenitor-derived macrophage following polymicrobial sepsis. J. Neuroimmunol. *158*, 50–57.

Muthu, K., He, L.-K., Szilagyi, A., Strotmon, P., Gamelli, R.L., and Shankar, R. (2010). β-Adrenergic stimulation increases macrophage CD14 expression and E. coli phagocytosis through PKA signaling mechanisms. J. Leukoc. Biol. *88*, 715–724.

Nakai, A., Hayano, Y., Furuta, F., Noda, M., and Suzuki, K. (2014). Control of lymphocyte egress from lymph nodes through β2-adrenergic receptors. J. Exp. Med. *211*, 2583–2598.

Neumann, E., Khawaja, K., and Müller-Ladner, U. (2014). G protein-coupled receptors in rheumatology. Nat. Rev. Rheumatol. *10*, 429–436.

Nicolaides, N.C., Galata, Z., Kino, T., Chrousos, G.P., and Charmandari, E. (2010). The Human Glucocorticoid Receptor: Molecular Basis of Biologic Function. Steroids *75*, 1.

Nijhuis, L.E., Olivier, B.J., Dhawan, S., Hilbers, F.W., Boon, L., Wolkers, M.C., Samsom, J.N., and de Jonge, W.J. (2014). Adrenergic β2 Receptor Activation Stimulates Anti-Inflammatory Properties of Dendritic Cells In Vitro. PLoS ONE *9*, e85086.

Nunes, P., Demaurex, N., and Dinauer, M.C. (2013). Regulation of the NADPH oxidase and associated ion fluxes during phagocytosis. Traffic Cph. Den. *14*, 1118–1131.

O'Connor, K.A., Johnson, J.D., Hansen, M.K., Wieseler Frank, J.L., Maksimova, E., Watkins, L.R., and Maier, S.F. (2003). Peripheral and central proinflammatory cytokine response to a severe acute stressor. Brain Res. *991*, 123–132.

Oeckinghaus, A., and Ghosh, S. (2009). The NF-κB Family of Transcription Factors and Its Regulation. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *1*.

O'Keeffe, M., Mok, W.H., and Radford, K.J. (2015). Human dendritic cell subsets and function in health and disease. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *72*, 4309–4325.

O'Neill, L.A.J., and Bowie, A.G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. Nat. Rev. Immunol. *7*, 353–364.

Oosting, M., Cheng, S.-C., Bolscher, J.M., Vestering-Stenger, R., Plantinga, T.S., Verschueren, I.C., Arts, P., Garritsen, A., van Eenennaam, H., Sturm, P., et al. (2014). Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, E4478-4484.

Ostedgaard, L.S., Meyerholz, D.K., Chen, J.-H., Pezzulo, A.A., Karp, P.H., Rokhlina, T., Ernst, S.E., Hanfland, R.A., Reznikov, L.R., Ludwig, P.S., et al. (2011). The ΔF508 Mutation Causes CFTR Misprocessing and Cystic Fibrosis-Like Disease in Pigs. Sci. Transl. Med. *3*, 74ra24.

Palermo-Neto, J., de Oliveira Massoco, C., and Robespierre de Souza, W. (2003). Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. Brain. Behav. Immun. *17*, 43–54.

Panina-Bordignon, P., Mazzeo, D., Lucia, P.D., D'Ambrosio, D., Lang, R., Fabbri, L., Self, C., and Sinigaglia, F. (1997). Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. J. Clin. Invest. *100*, 1513–1519.

Paul, S., Singh, A.K., Shilpi, null, and Lal, G. (2014). Phenotypic and functional plasticity of gamma-delta (γδ) T cells in inflammation and tolerance. Int. Rev. Immunol. *33*, 537–558.

Peaper, D.R., and Cresswell, P. (2008). Regulation of MHC Class I Assembly and Peptide Binding. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *24*, 343–368.

Peng, J., Yuan, Q., Lin, B., Panneerselvam, P., Wang, X., Luan, X.L., Lim, S.K., Leung, B.P., Ho, B., and Ding, J.L. (2010). SARM inhibits both TRIF- and MyD88-mediated AP-1 activation. Eur. J. Immunol. *40*, 1738–1747.

Pérez-Nievas, B.G., Madrigal, J.L.M., García-Bueno, B., Zoppi, S., and Leza, J.C. (2010). Corticosterone basal levels and vulnerability to LPS-induced neuroinflammation in the rat brain. Brain Res. *1315*, 159–168.

Perlstein, R.S., Whitnall, M.H., Abrams, J.S., Mougey, E.H., and Neta, R. (1993). Synergistic roles of interleukin-6, interleukin-1, and tumor necrosis factor in the adrenocorticotropin response to bacterial lipopolysaccharide in vivo. Endocrinology *132*, 946–952.

Persoons, J.H., Schornagel, K., Brevé, J., Berkenbosch, F., and Kraal, G. (1995). Acute stress affects cytokines and nitric oxide production by alveolar macrophages differently. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *152*, 619–624.

Pike, J.L., and Irwin, M.R. (2006). Dissociation of inflammatory markers and natural killer cell activity in major depressive disorder. Brain. Behav. Immun. *20*, 169–174.

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

Pochet, R., Delespesse, G., Gausset, P.W., and Collet, H. (1979). Distribution of beta-adrenergic receptors on human lymphocyte subpopulations. Clin. Exp. Immunol. *38*, 578–584.

Pohl, A., Otto, J., and Urbanek, R. (1991). Beta-2-adrenoceptors of polymorphonuclear leukocytes in children with atopic dermatitis. Their number and affinity to the radioligand [125I]-cyanopindolol. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. *95*, 261–265.

van der Poll, T., Jansen, J., Endert, E., Sauerwein, H.P., and van Deventer, S.J. (1994). Noradrenaline inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin 6 production in human whole blood. Infect. Immun. *62*, 2046–2050.

Pongratz, G., McAlees, J.W., Conrad, D.H., Erbe, R.S., Haas, K.M., and Sanders, V.M. (2006). The level of IgE produced by a B cell is regulated by norepinephrine in a p38 MAPK- and CD23-dependent manner. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *177*, 2926–2938.

Powell, N.D., Bailey, M.T., Mays, J.W., Stiner-Jones, L.M., Hanke, M.L., Padgett, D.A., and Sheridan, J.F. (2009). Repeated social defeat activates dendritic cells and enhances Toll-like receptor dependent cytokine secretion. Brain. Behav. Immun. *23*, 225–231.

Pratt, W.B., and Toft, D.O. (1997). Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones. Endocr. Rev. *18*, 306–360.

Pruessner, J.C., Dedovic, K., Khalili-Mahani, N., Engert, V., Pruessner, M., Buss, C., Renwick, R., Dagher, A., Meaney, M.J., and Lupien, S. (2008). Deactivation of the limbic system during acute psychosocial stress: evidence from positron emission tomography and functional magnetic resonance imaging studies. Biol. Psychiatry *63*, 234–240.

Prunier, A., Heinonen, M., and Quesnel, H. (2010). High physiological demands in intensively raised pigs: impact on health and welfare. Anim. Int. J. Anim. Biosci. *4*, 886–898.

Pujols, L., Mullol, J., Torrego, A., and Picado, C. (2004). Glucocorticoid receptors in human airways. Allergy *59*, 1042–1052.

Quan, N., Avitsur, R., Stark, J.L., He, L., Shah, M., Caligiuri, M., Padgett, D.A., Marucha, P.T., and Sheridan, J.F. (2001). Social stress increases the susceptibility to endotoxic shock. J. Neuroimmunol. *115*, 36–45.

Ramer-Quinn, D.S., Swanson, M.A., Lee, W.T., and Sanders, V.M. (2000). Cytokine Production by Naive and Primary Effector CD4+ T Cells Exposed to Norepinephrine. Brain. Behav. Immun. *14*, 239–255.

Rasmussen, S.G.F., Choi, H.-J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R.P., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., et al. (2007). Crystal structure of the human β2 adrenergic G-protein-coupled receptor. Nature *450*, 383–387.

Reimert, I., Bolhuis, J.E., Kemp, B., and Rodenburg, T.B. (2013). Indicators of positive and negative emotions and emotional contagion in pigs. Physiol. Behav. *109*, 42–50.

Reimert, I., Bolhuis, J.E., Kemp, B., and Rodenburg, T.B. (2014). Social support in pigs with different coping styles. Physiol. Behav. *129*, 221–229.

Renard, C., Hart, E., Sehra, H., Beasley, H., Coggill, P., Howe, K., Harrow, J., Gilbert, J., Sims, S., Rogers, J., et al. (2006). The genomic sequence and analysis of the swine major histocompatibility complex. Genomics *88*, 96–110.

Ricci, A., Bronzetti, E., Conterno, A., Greco, S., Mulatero, P., Schena, M., Schiavone, D., Tayebati, S.K., Veglio, F., and Amenta, F. (1999). alpha1-adrenergic receptor subtypes in human peripheral blood lymphocytes. Hypertens. Dallas Tex 1979 *33*, 708–712.

Rice, P.A., Boehm, G.W., Moynihan, J.A., Bellinger, D.L., and Stevens, S.Y. (2002). Chemical Sympathectomy Alters Numbers of Splenic and Peritoneal Leukocytes. Brain. Behav. Immun. *16*, 62–73.

Roche, P.A., and Furuta, K. (2015). The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. Nat. Rev. Immunol. *15*, 203–216.

Rogers, C.S., Stoltz, D.A., Meyerholz, D.K., Ostedgaard, L.S., Rokhlina, T., Taft, P.J., Rogan, M.P., Pezzulo, A.A., Karp, P.H., Itani, O.A., et al. (2008). Disruption of the CFTR Gene Produces a Model of Cystic Fibrosis in Newborn Pigs. Science *321*, 1837–1841.

Rohleder, N. (2012). Acute and chronic stress induced changes in sensitivity of peripheral inflammatory pathways to the signals of multiple stress systems --2011 Curt Richter Award Winner. Psychoneuroendocrinology *37*, 307–316.

Romero, L.M., Dickens, M.J., and Cyr, N.E. (2009). The Reactive Scope Model - a new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. Horm. Behav. *55*, 375–389.

van Rossum, E.F.C., Koper, J.W., Huizenga, N.A.T.M., Uitterlinden, A.G., Janssen, J.A.M.J.L., Brinkmann, A.O., Grobbee, D.E., de Jong, F.H., van Duyn, C.M., Pols, H.A.P., et al. (2002). A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. Diabetes *51*, 3128–3134.

Rothkötter, H.-J. (2009). Anatomical particularities of the porcine immune system--a physician's view. Dev. Comp. Immunol. *33*, 267–272.

Ruis, M.A., te Brake, J.H., Engel, B., Buist, W.G., Blokhuis, H.J., and Koolhaas, J.M. (2001). Adaptation to social isolation. Acute and long-term stress responses of growing gilts with different coping characteristics. Physiol. Behav. *73*, 541–551.

Saalmüller, A., Pauly, T., Höhlich, B.-J., and Pfaff, E. (1999). Characterization of porcine T lymphocytes and their immune response against viral antigens. J. Biotechnol. *73*, 223–233.

Saint-Mezard, P., Chavagnac, C., Bosset, S., Ionescu, M., Peyron, E., Kaiserlian, D., Nicolas, J.-F., and Bérard, F. (2003). Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions in vivo. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *171*, 4073–4080.

Salak-Johnson, J.L., McGlone, J.J., and Norman, R.L. (1996). In vivo glucocorticoid effects on porcine natural killer cell activity and circulating leukocytes. J. Anim. Sci. *74*, 584–592.

Sánchez, C., Doménech, N., Vázquez, J., Alonso, F., Ezquerra, A., and Domínguez, J. (1999). The porcine 2A10 antigen is homologous to human CD163 and related to macrophage differentiation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *162*, 5230–5237.

Sanders, V.M., Baker, R.A., Ramer-Quinn, D.S., Kasprowicz, D.J., Fuchs, B.A., and Street, N.E. (1997). Differential expression of the beta2-adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones: implications for cytokine production and B cell help. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *158*, 4200–4210.

Sang, Y., Patil, A.A., Zhang, G., Ross, C.R., and Blecha, F. (2006). Bioinformatic and expression analysis of novel porcine beta-defensins. Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc. *17*, 332–339.

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

Sapolsky, R.M., Krey, L.C., and McEwen, B.S. (1984). Stress down-regulates corticosterone receptors in a site-specific manner in the brain. Endocrinology *114*, 287–292.

Saravia-Fernandez, F., Durant, S., el Hasnaoui, A., Dardenne, M., and Homo-Delarche, F. (1996). Environmental and experimental procedures leading to variations in the incidence of diabetes in the nonobese diabetic (NOD) mouse. Autoimmunity *24*, 113–121.

Savignac, H.M., Hyland, N.P., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2011). The effects of repeated social interaction stress on behavioural and physiological parameters in a stress-sensitive mouse strain. Behav. Brain Res. *216*, 576–584.

Schedlowski, M., Jacobs, R., Stratmann, G., Richter, S., Hädicke, A., Tewes, U., Wagner, T.O.F., and Schmidt, R.E. (1993). Changes of natural killer cells during acute psychological stress. J. Clin. Immunol. *13*, 119–126.

Schedlowski, M., Hosch, W., Oberbeck, R., Benschop, R.J., Jacobs, R., Raab, H.R., and Schmidt, R.E. (1996). Catecholamines modulate human NK cell circulation and function via spleen-independent beta 2-adrenergic mechanisms. J. Immunol. *156*, 93–99.

Schneemann, M., and Schoeden, G. (2007). Macrophage biology and immunology: man is not a mouse. J. Leukoc. Biol. *81*, 579–579.

Schrader, L., and Todt, D. (1998). Vocal Quality is Correlated with Levels of Stress Hormones in Domestic Pigs. Ethology *104*, 859–876.

Schulz, C., Perdiguero, E.G., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E.W., Pollard, J.W., et al. (2012). A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells. Science *336*, 86–90.

Seaton, M., Hocking, A., and Gibran, N.S. (2015). Porcine Models of Cutaneous Wound Healing. ILAR J. *56*, 127–138.

Selye, H. (1950). Stress and the General Adaptation Syndrome. Br. Med. J. *1*, 1383–1392.

Sesti-Costa, R., Ignacchiti, M.D.C., Chedraoui-Silva, S., Marchi, L.F., and Mantovani, B. (2012). Chronic cold stress in mice induces a regulatory phenotype in macrophages: Correlation with increased 11β-hydroxysteroid dehydrogenase expression. Brain. Behav. Immun. *26*, 50–60.

SGOIFO, A., DE BOER, S.F., HALLER, J., and KOOLHAAS, J.M. (1996). Individual Differences in Plasma

Catecholamine and Corticosterone Stress Responses of Wild-Type Rats: Relationship With Aggression. Physiol. Behav. *60*, 1403–1407.
Shaulian, E., and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. Nat. Cell Biol. *4*, E131-136.
Shi, J., Zhang, G., Wu, H., Ross, C., Blecha, F., and Ganz, T. (1999). Porcine epithelial beta-defensin 1 is expressed in the dorsal tongue at antimicrobial concentrations. Infect. Immun. *67*, 3121–3127.
Shimosato, T., Tohno, M., Kitazawa, H., Katoh, S., Watanabe, K., Kawai, Y., Aso, H., Yamaguchi, T., and Saito, T. (2005). Toll-like receptor 9 is expressed on follicle-associated epithelia containing M cells in swine Peyer's patches. Immunol. Lett. *98*, 83–89.
Shinkai, H., Muneta, Y., Suzuki, K., Eguchi-Ogawa, T., Awata, T., and Uenishi, H. (2006). Porcine Toll-like receptor 1, 6, and 10 genes: complete sequencing of genomic region and expression analysis. Mol. Immunol. *43*, 1474–1480.
Silberman, D.M., Wald, M.R., and Genaro, A.M. (2003). Acute and chronic stress exert opposing effects on antibody responses associated with changes in stress hormone regulation of T-lymphocyte reactivity. J. Neuroimmunol. *144*, 53–60.
Singleton, H., Graham, S.P., Bodman-Smith, K.B., Frossard, J.-P., and Steinbach, F. (2016). Establishing Porcine Monocyte-Derived Macrophage and Dendritic Cell Systems for Studying the Interaction with PRRSV-1. Front. Microbiol. *7*.
Sinkora, M., and Butler, J.E. (2016). Progress in the use of swine in developmental immunology of B and T lymphocytes. Dev. Comp. Immunol. *58*, 1–17.
Slota, C., Shi, A., Chen, G., Bevans, M., and Weng, N. (2015). Norepinephrine preferentially modulates memory CD8 T cell function inducing inflammatory cytokine production and reducing proliferation in response to activation. Brain. Behav. Immun. *46*, 168–179.
Smith, S.M., and Vale, W.W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. Dialogues Clin. Neurosci. *8*, 383–395.
Snoeck, V., Peters, I.R., and Cox, E. (2006). The IgA system: a comparison of structure and function in different species. Vet. Res. *37*, 455–467.
Spake, J.R., Gray, K.A., and Cassady, J.P. (2012). Relationship between backtest and coping styles in pigs. Appl. Anim. Behav. Sci. *140*, 146–153.
Spengler, R.N., Allen, R.M., Remick, D.G., Strieter, R.M., and Kunkel, S.L. (1990). Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *145*, 1430–1434.
van der Spoel, T.I.G., Jansen of Lorkeers, S.J., Agostoni, P., van Belle, E., Gyöngyösi, M., Sluijter, J.P.G., Cramer, M.J., Doevendans, P.A., and Chamuleau, S.A.J. (2011). Human relevance of pre-clinical studies in stem cell therapy: systematic review and meta-analysis of large animal models of ischaemic heart disease. Cardiovasc. Res. *91*, 649–658.
Stahn, C., Löwenberg, M., Hommes, D.W., and Buttgereit, F. (2007). Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. Mol. Cell. Endocrinol. *275*, 71–78.
Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. J. Exp. Med. *176*, 287–292.
Stephens, M.A.C., Mahon, P.B., McCaul, M.E., and Wand, G.S. (2016). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to acute psychosocial stress: Effects of biological sex and circulating sex hormones. Psychoneuroendocrinology *66*, 47–55.
Steptoe, A., Hamer, M., and Chida, Y. (2007). The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: A review and meta-analysis. Brain. Behav. Immun. *21*, 901–912.
Sterling P, and Eyer J (1988). Allostasis : A new paradigm to explain arousal pathology. In Handbook of Life Stress, Cognition and Health, (S. Fisher and J. Reason), pp. 629–649.
Strahler, J., Rohleder, N., and Wolf, J.M. (2015). Acute psychosocial stress induces differential short-term changes in catecholamine sensitivity of stimulated inflammatory cytokine production. Brain. Behav. Immun. *43*, 139–148.
Streby, K.A., Shah, N., Ranalli, M.A., Kunkler, A., and Cripe, T.P. (2015). Nothing but NET: A review of norepinephrine transporter expression and efficacy of 131I-mIBG therapy. Pediatr. Blood Cancer *62*, 5–11.
Strell, C., Sievers, A., Bastian, P., Lang, K., Niggemann, B., Zänker, K.S., and Entschladen, F. (2009). Divergent effects of norepinephrine, dopamine and substance P on the activation, differentiation and effector functions of human cytotoxic T lymphocytes. BMC Immunol. *10*, 62.
Stroud, L.R., Foster, E., Papandonatos, G.D., Handwerger, K., Granger, D.A., Kivlighan, K.T., and Niaura, R. (2009). Stress Response and the Adolescent Transition: Performance versus Peer Rejection Stressors. Dev. Psychopathol. *21*, 47–68.
Stuehr, D.J., and Marletta, M.A. (1985). Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite

and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *82*, 7738–7742.
Suarez-Carmona, M., Hubert, P., Delvenne, P., and Herfs, M. (2015). Defensins: "Simple" antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules? Cytokine Growth Factor Rev. *26*, 361–370.
Sudan, B., Wacker, M.A., Wilson, M.E., and Graff, J.W. (2015). A Systematic Approach to Identify Markers of Distinctly Activated Human Macrophages. Front. Immunol. *6*, 253.
Sullivan, R.M., and Gratton, A. (1999). Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *19*, 2834–2840.
Summerfield, A., Rziha, H.J., and Saalmüller, A. (1996). Functional characterization of porcine CD4+CD8+ extrathymic T lymphocytes. Cell. Immunol. *168*, 291–296.
Sutherland, M.A., Niekamp, S.R., Rodriguez-Zas, S.L., and Salak-Johnson, J.L. (2006). Impacts of chronic stress and social status on various physiological and performance measures in pigs of different breeds. J. Anim. Sci. *84*, 588–596.
Sutterwala, F.S., Noel, G.J., Salgame, P., and Mosser, D.M. (1998). Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fcgamma receptor type I. J. Exp. Med. *188*, 217–222.
Suzuki, Y., Yeung, A.C., and Ikeno, F. (2010). The Representative Porcine Model for Human Cardiovascular Disease. BioMed Res. Int. *2011*, e195483.
Swain, S.L., McKinstry, K.K., and Strutt, T.M. (2012). Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses. Nat. Rev. Immunol. *12*, 136–148.
Swanson, M.A., Lee, W.T., and Sanders, V.M. (2001). IFN-gamma production by Th1 cells generated from naive CD4+ T cells exposed to norepinephrine. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *166*, 232–240.
Tabarowski, Z., Gibson-Berry, K., and Felten, S.Y. (1996). Noradrenergic and peptidergic innervation of the mouse femur bone marrow. Acta Histochem. *98*, 453–457.
Takashi, S., Okubo, Y., and Horie, S. (2001). Contribution of CD54 to human eosinophil and neutrophil superoxide production. J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 *91*, 613–622.
Tanaka, S., Tsutsui, M., Kishida, T., Souma, S., Kuroda, J., and Yoshida, T. (2010). Salbutamol inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in rat peritoneal macrophages. J. Toxicol. Sci. *35*, 327–334.
Tanaka, Y., Sano, S., Nieves, E., De Libero, G., Rosa, D., Modlin, R.L., Brenner, M.B., Bloom, B.R., and Morita, C.T. (1994). Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 8175–8179.
Tangye, S.G., Ma, C.S., Brink, R., and Deenick, E.K. (2013). The good, the bad and the ugly — TFH cells in human health and disease. Nat. Rev. Immunol. *13*, 412–426.
Teijeira, A., Russo, E., and Halin, C. (2014). Taking the lymphatic route: dendritic cell migration to draining lymph nodes. Semin. Immunopathol. *36*, 261–274.
Thaker, P.H., Han, L.Y., Kamat, A.A., Arevalo, J.M., Takahashi, R., Lu, C., Jennings, N.B., Armaiz-Pena, G., Bankson, J.A., Ravoori, M., et al. (2006). Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. Nat. Med. *12*, 939–944.
Thomas, A.C., and Mattila, J.T. (2014). "Of Mice and Men": Arginine Metabolism in Macrophages. Front. Immunol. *5*.
Thomas, A.V., Broers, A.D., Vandegaart, H.F., and Desmecht, D.J.-M. (2006). Genomic structure, promoter analysis and expression of the porcine (Sus scrofa) TLR4 gene. Mol. Immunol. *43*, 653–659.
Titinchi, S., and Clark, B. (1984). Alpha 2-adrenoceptors in human lymphocytes: direct characterisation by [3H]yohimbine binding. Biochem. Biophys. Res. Commun. *121*, 1–7.
Tony, J.C. (2003). The chromogranin-secretogranin family. N. Engl. J. Med. *348*, 2579-2580-2580.
Tsao, C.-W., Cheng, J.-T., Shen, C.-L., and Lin, Y.-S. (1996). 6-Hydroxydopamine induces thymocyte apoptosis in mice. J. Neuroimmunol. *65*, 91–95.
Tsukamoto, K., and Machida, K. (2012). Effects of life events and stress on neutrophil functions in elderly men. Immun. Ageing *9*, 13.
Tuchscherer, M., Kanitz, E., Otten, W., and Tuchscherer, A. (2002). Effects of prenatal stress on cellular and humoral immune responses in neonatal pigs. Vet. Immunol. Immunopathol. *86*, 195–203.
Tuchscherer, M., Kanitz, E., Puppe, B., Tuchscherer, A., and Viergutz, T. (2009). Changes in endocrine and immune responses of neonatal pigs exposed to a psychosocial stressor. Res. Vet. Sci. *87*, 380–388.
Tuchscherer, M., Kanitz, E., Puppe, B., and Tuchscherer, A. (2010). Altered immunomodulation by glucocorticoids in neonatal pigs exposed to a psychosocial stressor. Pediatr. Res. *68*, 473–478.
Tugal, D., Liao, X., and Jain, M.K. (2013). Transcriptional Control of Macrophage Polarization. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *33*, 1135–1144.
Underhill, D.M., and Ozinsky, A. (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in action. Annu. Rev. Immunol. *20*, 825–852.
Valentino, R.J., Foote, S.L., and Aston-Jones, G. (1983). Corticotropin-releasing factor activates noradrenergic

neurons of the locus coeruleus. Brain Res. *270*, 363–367.
Valentino, R.J., Page, M., Van Bockstaele, E., and Aston-Jones, G. (1992). Corticotropin-releasing factor innervation of the locus coeruleus region: Distribution of fibers and sources of input. Neuroscience *48*, 689–705.
de Vente, W., van Amsterdam, J.G.C., Olff, M., Kamphuis, J.H., and Emmelkamp, P.M.G. (2015). Burnout Is Associated with Reduced Parasympathetic Activity and Reduced HPA Axis Responsiveness, Predominantly in Males. BioMed Res. Int. *2015*, 431725.
Verbrugghe, E., Boyen, F., Van Parys, A., Van Deun, K., Croubels, S., Thompson, A., Shearer, N., Leyman, B., Haesebrouck, F., and Pasmans, F. (2011). Stress induced Salmonella Typhimurium recrudescence in pigs coincides with cortisol induced increased intracellular proliferation in macrophages. Vet. Res. *42*, 118.
Visser, J., van Boxel-Dezaire, A., Methorst, D., Brunt, T., de Kloet, E.R., and Nagelkerken, L. (1998). Differential regulation of interleukin-10 (IL-10) and IL-12 by glucocorticoids in vitro. Blood *91*, 4255–4264.
Viswanathan, K., Daugherty, C., and Dhabhar, F.S. (2005). Stress as an endogenous adjuvant: augmentation of the immunization phase of cell-mediated immunity. Int. Immunol. *17*, 1059–1069.
Wahle, M., Greulich, T., Baerwald, C.G.O., Häntzschel, H., and Kaufmann, A. (2005). Influence of catecholamines on cytokine production and expression of adhesion molecules of human neutrophils in vitro. Immunobiology *210*, 43–52.
Weatherby, K.E., Zwilling, B.S., and Lafuse, W.P. (2003). Resistance of macrophages to Mycobacterium avium is induced by alpha2-adrenergic stimulation. Infect. Immun. *71*, 22–29.
Weber, A., and Jaekel-Reinhard, A. (2000). Burnout syndrome: a disease of modern societies? Occup. Med. Oxf. Engl. *50*, 512–517.
White, H.M., Richert, B.T., Schinckel, A.P., Burgess, J.R., Donkin, S.S., and Latour, M.A. (2008). Effects of temperature stress on growth performance and bacon quality in grow-finish pigs housed at two densities. J. Anim. Sci. *86*, 1789–1798.
White, R.G., DeShazer, J.A., Tressler, C.J., Borcher, G.M., Davey, S., Waninge, A., Parkhurst, A.M., Milanuk, M.J., and Clemens, E.T. (1995). Vocalization and physiological response of pigs during castration with or without a local anesthetic. J. Anim. Sci. *73*, 381–386.
Williams, J.M., Peterson, R.G., Shea, P.A., Schmedtje, J.F., Bauer, D.C., and Felten, D.L. (1981). Sympathetic innervation of murine thymus and spleen: evidence for a functional link between the nervous and immune systems. Brain Res. Bull. *6*, 83–94.
Willner, P., Muscat, R., and Papp, M. (1992). Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. Neurosci. Biobehav. Rev. *16*, 525–534.
Wirtz, P.H., von Känel, R., Emini, L., Suter, T., Fontana, A., and Ehlert, U. (2007). Variations in anticipatory cognitive stress appraisal and differential proinflammatory cytokine expression in response to acute stress. Brain. Behav. Immun. *21*, 851–859.
Workman, C.J., Szymczak-Workman, A.L., Collison, L.W., Pillai, M.R., and Vignali, D.A.A. (2009). The development and function of regulatory T cells. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *66*, 2603–2622.
Wrona, D., Trojniar, W., Borman, A., Ciepielewski, Z., and Tokarski, J. (2001). Stress-induced changes in peripheral natural killer cell cytotoxicity in pigs may not depend on plasma cortisol. Brain. Behav. Immun. *15*, 54–64.
Xiu, F., Stanojcic, M., and Jeschke, M.G. (2013). Norepinephrine Inhibits Macrophage Migration by Decreasing CCR2 Expression. PLoS ONE *8*.
Yamamoto, M., and Takeda, K. (2010). Current Views of Toll-Like Receptor Signaling Pathways. Gastroenterol. Res. Pract. *2010*, e240365.
Yanagawa, Y., Matsumoto, M., and Togashi, H. (2010). Enhanced Dendritic Cell Antigen Uptake via α2 Adrenoceptor-Mediated PI3K Activation Following Brief Exposure to Noradrenaline. J. Immunol. *185*, 5762–5768.
Yang, H., and Parkhouse, R.M. (1996). Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. Immunology *89*, 76–83.
Yates, R.M., Hermetter, A., Taylor, G.A., and Russell, D.G. (2007). Macrophage activation downregulates the degradative capacity of the phagosome. Traffic Cph. Den. *8*, 241–250.
Yokosuka, T., and Saito, T. (2010). The Immunological Synapse, TCR Microclusters, and T Cell Activation. In Immunological Synapse, T. Saito, and F.D. Batista, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 81–107.
You, Z., Luo, C., Zhang, W., Chen, Y., He, J., Zhao, Q., Zuo, R., and Wu, Y. (2011). Pro- and anti-inflammatory cytokines expression in rat's brain and spleen exposed to chronic mild stress: Involvement in depression. Behav. Brain Res. *225*, 135–141.
Zelnickova, P., Matiasovic, J., Pavlova, B., Kudlackova, H., Kovaru, F., and Faldyna, M. (2008). Quantitative nitric oxide production by rat, bovine and porcine macrophages. Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc. *19*, 36–41.

Zheng, M., Zhang, S.-J., Zhu, W.-Z., Ziman, B., Kobilka, B.K., and Xiao, R.-P. (2000). β2-Adrenergic Receptor-induced p38 MAPK Activation Is Mediated by Protein Kinase A Rather than by Gi or Gβγ in Adult Mouse Cardiomyocytes. J. Biol. Chem. *275*, 40635–40640.

Zhou, J., Yan, J., Liang, H., and Jiang, J. (2014). Epinephrine enhances the response of macrophages under LPS stimulation. BioMed Res. Int. *2014*, 254686.

Zuckermann, F.A., and Husmann, R.J. (1996). Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. Immunology *87*, 500–512.

Zwilling, B.S., Brown, D., Feng, N., Sheridan, J., and Pearl, D. (1993). The effect of adrenalectomy on the restraint stressed induced suppression of MHC class II expression by murine peritoneal macrophages. Brain. Behav. Immun. *7*, 29–35.

UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

Oniris
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE, AGROALIMENTAIRE ET DE L'ALIMENTATION
SANTÉ ET ALIMENTATION AU CŒUR DE LA VIE

Thèse de Doctorat

Elodie BACOU

De l'importance des médiateurs du stress dans le contrôle de l'immunité

On the importance of stress mediators in the control of immunity

Résumé

En élevage intensif, les porcs sont exposés à de nombreux facteurs de stress qui pourraient favoriser la survenue d'infections et contribuer à l'utilisation massive d'antibiotiques. Les facteurs de stress activent principalement l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et l'axe sympatho-adréno-médullaire qui contribuent au retour à l'état d'équilibre. Les médiateurs de ces deux axes, les glucocorticoïdes et les catécholamines, peuvent moduler les réponses immunitaires d'un individu. Dans ce contexte, les objectifs de ma thèse étaient de décrire (i) les effets d'un stress social aigu chez des porcelets forts et faibles répondeurs à une stimulation à l'ACTH sur des paramètres immunitaires et (ii) les effets des catécholamines sur les macrophages porcins. Un mélange de loge durant 1h avec des congénères non familiers induit une mobilisation leucocytaire mais altère la plupart des fonctions immunitaires analysées. Si la majorité des paramètres immunitaires testés ne diffère pas entre les porcelets des 2 groupes, les porcelets avec un axe corticotrope fort semblent plus résilients au stress ce qui encourage à poursuivre cette stratégie de sélection génétique pour produire des porcs robustes. Les effets des catécholamines sur les macrophages ont ensuite été étudiés plus spécifiquement *in vitro*. L'activation du récepteur β2-adrénergique affecte la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induite par le LPS et diminue l'expression des marqueurs pro-inflammatoires par les macrophages. L'ensemble des résultats obtenus avec des approches *in vivo* et *in vitro* devrait permettre une meilleure compréhension des relations entre stress et immunité chez le porc.

Mots clés
stress, porc, cortisol, catécholamines, macrophages, neuroimmunomodulation

Abstract

In intensive husbandry, pigs are exposed to multiple stressful events, which are thought to impair immune defences and may contribute to the prophylactic use of antibiotics. Stressors mainly activate hypothalamo-pituitary-adrenocortical (HPA) and sympatho-adreno-medullar axes, which both contribute to restore homeostasis. Glucocorticoids and catecholamines are mediators of these two pathways and may modulate immune responses. In this context, my PhD project aimed (i) to describe acute social stress effects on immune traits in piglets high and low responders to ACTH stimulation and (ii) to analyze catecholamine effects on porcine macrophages *in vitro*. One-hour mixing with unfamiliar conspecifics increases leucocyte mobilization and affects most of tested immune functions. Although most immune parameters do not differ between piglets from both groups, stress effects were less pronounced in piglets with a strong HPA axis. Thus, selecting piglets with a strong HPA axis seems a valuable tool to produce robust animals. Catecholamine effects were then more specifically studied on macrophages *in vitro*. β2-adrenergic receptor activation affects LPS-induced pro-inflammatory cytokine secretion and decreases pro-inflammatory marker expression in porcine macrophages. Altogether these data obtained using *in vivo* and *in vitro* experiments should allow a better understanding of the relationships between stress and immunity in pigs.

Key Words
stress, pig, cortisol, catecholamines, macrophages, neuroimmunomodulation