



HAL
open science

Effets de la pollution sur le système immunitaire des animaux

Nina Carpentier

► **To cite this version:**

Nina Carpentier. Effets de la pollution sur le système immunitaire des animaux. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04414406

HAL Id: dumas-04414406

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04414406>

Submitted on 24 Jan 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Année 2023

EFFETS DE LA POLLUTION SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE DES ANIMAUX

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 10 novembre 2023

par

Nina, Jeanne, Nicole CARPENTIER

sous la direction de

Delphine LE ROUX

JURY

Présidente du jury :	Mme Caroline GILBERT	Professeure à l'EnvA
Directrice de thèse :	Mme Delphine LE ROUX	Maître de Conférences à l'EnvA
Examinatrice :	Mme Sophie LE PODER	Professeure à l'EnvA

Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



Version juillet 2023

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigé	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
M	Blaga	Radu	Professeur	DSBP
M	Blot	Stéphane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crevier-Dencix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquillet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Eloit	Marc	Professeur	DSBP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Federighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Professeur	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences HDR	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guéneq	Christelle	Professeur	DEPEC
M	Millermann	Yves	Professeur	DPASP
Mme	Pilot-Storck	Fanny	Professeur	DSBP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Arné	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barbarino	Alix	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Benckroun	Ghita	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
M	Bolnot	Francois	Maître de conférences	DPASP
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Coudry	Virginie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP
M	Crozet	Guillaume	Maître de conférences	DPASP
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences	DPASP
Mme	Denis	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guérin	Virginie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Guélin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Kurtz	Maxime	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Dudal	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
M	Mammeri	Mohamed	Maître de conférences	DSBP
Mme	Manguin	Estelle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
Mme	Marotto	Stéphanie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mespoules-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mtinet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Quéré	Émilie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Ravary-Plumioën	Bérangère	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP
M	Tanquerel	Ludovic	Maître de conférences	DEPEC

Remerciements

À Mme Caroline GILBERT, Professeure à l'EnvA,
D'avoir accepté la présidence du jury de cette thèse,
Sincères remerciements,

À Mme Delphine LE ROUX, Maître de conférences à l'EnvA,
Pour m'avoir proposé un sujet de thèse qui m'a passionné ainsi que pour son encadrement et sa pédagogie lors de la réalisation des manipulations au laboratoire du Biopôle,
Qu'elle trouve l'expression de ma sincère gratitude,

À Mme Sophie LE PODER, Professeure à l'EnvA,
Pour avoir accepté d'être l'examinatrice de cette thèse,
Sincères remerciements,

À toute l'équipe du laboratoire Biopôle,
Pour leur accueil et leur aide lors des manipulations au laboratoire,
Sincères remerciements,

À tous les étudiants et personnels de l'EnvA ayant accepté de participer à notre étude qui n'aurait pas pu exister sans leurs chiens,
Sincères remerciements,

À mes parents, mon frère et toute ma famille,
Pour votre soutien inconditionnel qui m'a permis de toujours avoir le courage de continuer même dans les moments de doute, Merci, je vous aime,

À Donatien,
Pour ton aide précieuse sur les statistiques et la relecture du manuscrit, bientôt ce sera toi le Docteur, je t'aime,

À Louise, depuis la primaire on se serre les coudes et c'est loin d'être fini, Merci d'être toi,

À mes amis, Clémence, Charlotte, Valentine, Ségolène, Lucas et tous ceux qui se reconnaîtront, Merci de toujours être là,

À mon groupe de clinique, Marine, Marine, Claire et Téliou, Merci, sans vous la dernière année aurait été bien moins drôle.

Table des matières

Liste des figures.....	3
Liste des tableaux	7
Liste des abréviations.....	9
Introduction	13
Première partie	15
I. Rappels sur le système immunitaire	15
1. <i>Immunité innée</i>	15
A. Les cellules mises en jeu dans l'immunité innée.....	16
a. Polynucléaires	16
b. Phagocytes mononucléés.....	16
c. Autres cellules	17
B. Médiateurs chimiques et humoraux	17
a. Complément	17
b. Cytokines	18
2. <i>Immunité adaptative</i>	18
A. Déclenchement de la réponse immunitaire adaptative par les cellules présentatrices d'antigènes	18
B. Lymphocytes T.....	19
C. Lymphocytes B	20
D. La mémoire immunitaire.....	21
E. Bilan sur l'immunité adaptative	21
3. <i>Les différents facteurs ayant une influence connue sur le SI</i>	22
II. La pollution, un impact sur le système immunitaire.....	23
1. <i>Les animaux comme sentinelles de la pollution environnementale</i>	23
2. <i>Les principaux polluants connus ayant un impact sur le système immunitaire</i>	25
A. Les métaux lourds.....	25
a. Le cadmium	27
b. L'arsenic	29
c. Le plomb	31
d. Le mercure.....	35
e. Le cuivre	37
f. Synthèse.....	38
B. Polluants du sol et de l'eau	39
a. Les retardateurs de flamme bromés et les polychlorobiphényles	39
b. Pesticides	40
c. Xénoœstrogènes	41
d. Gaz et pétrole non conventionnels	42
e. Micro plastiques	44
f. Synthèse.....	46
C. Polluants de l'air.....	46
a. Composition et effets connus sur la santé	47
b. Hydrocarbures aromatiques polycycliques et dioxine	48
c. Ozone	49
d. Synthèse.....	51
3. <i>Le tabagisme et le système immunitaire</i>	51
A. Composition de la fumée émise par les cigarettes.....	51
B. Effets connus du tabagisme sur le système immunitaire	53
a. Effets de la nicotine sur le système immunitaire	54
b. Effets du tabac sur l'immunité innée	55
c. Effet du tabagisme sur l'immunité adaptative	57
C. <i>Quid de la e-cigarette ?</i>	58
D. Synthèse	60

Deuxième partie.....	61
I. Introduction	61
II. Matériels et méthodes	62
1. <i>Recrutement et prélèvement.....</i>	62
A. Inclusion dans les cohortes.....	62
B. Prélèvement sanguin et constitution des cohortes.....	62
2. <i>Isolement des PBMCs et du plasma.....</i>	63
3. <i>Numération formule sanguine.....</i>	64
4. <i>Etude des leucocytes mononuclés par cytométrie de flux.....</i>	64
A. Principe de la méthode par cytométrie de flux	64
B. Préparation des cellules, fixation et marquage	66
C. Lecture des données par le cytomètre de flux	68
5. <i>Technique ELISA sandwich pour la mesure de cytokines.....</i>	71
6. <i>Technique ELISA sandwich pour la mesure de la cotinine plasmatique.....</i>	72
A. Intérêt du dosage de la cotinine dans cette étude.....	72
B. Protocole ELISA sandwich pour le dosage de la cotinine plasmatique.....	73
7. <i>Méthodes statistiques d'analyse des données</i>	73
III. Résultats	74
1. <i>Données statistiques des deux groupes.....</i>	74
2. <i>Résultats de NFS.....</i>	75
3. <i>Résultats de cytométrie de flux.....</i>	76
4. <i>Résultats des ELISA des cytokines IL-6 et TNFα.....</i>	81
5. <i>Résultats de l'ELISA cotinine.....</i>	82
IV. Discussion.....	83
1. <i>Discussion sur les résultats de NFS.....</i>	83
2. <i>Discussion sur les résultats de cytométrie de flux.....</i>	85
3. <i>Discussion sur les résultats d'ELISA cytokines IL-6 et TNFα.....</i>	88
4. <i>Discussion sur les résultats d'ELISA cotinine.....</i>	89
5. <i>Limites de l'étude.....</i>	90
Conclusion.....	93
Liste des références bibliographiques	95
Annexe 1 : Formulaire de validation du protocole expérimental par le ComERC.....	117
Annexe 2 : Questionnaire d'inclusion dans l'étude donné aux propriétaires	118
Annexe 3 : Formulaire de consentement à la participation dans l'étude	119
Annexe 4 : Données brutes d'inclusion des chiens dans l'étude	120
Annexe 5 : Données brutes de NFS	122
Annexe 6 : Données brutes de cytométrie de flux	124
Annexe 7 : Données brutes des ELISA cytokines IL-6 et TNFα	127
Annexe 8 : Données brutes de l'ELISA cotinine	128
Annexe 9 : Résultats stratifiés sur le sexe des chiens	129

Liste des figures

Figure 1 : Séparation temporelle et principaux acteurs cellulaires et moléculaires mis en jeu dans les deux immunités innée et adaptative. Modifié d'après Abbas et Lichtman (2008), Bonilla et Oettgen, (2010), Parkin et Cohen (2001)	15
Figure 2 : Mise en place des différents complexes présentateurs d'antigènes au sein des cellules d'après Albert, 2017	19
Figure 3 : Les différentes voies de différenciation des LTCD4 selon les cytokines présentes dans leur milieu et les cytokines qu'elles produisent respectivement Source : Bonilla et Oettgen, 2010	20
Figure 4 : Bilan sur les acteurs de l'immunité adaptative. Source : Parkin et Cohen, 2001	22
Figure 5 : Illustration des différentes zones d'impact sur l'organisme de la concentration d'un métal modifié d'après Das <i>et al.</i> , 2019	25
Figure 6 : Les différents organes touchés par les métaux lourds Chrome (Cr), Arsenic (As), Cadmium (Cd), Plomb (Pb), Cuivre (Cu) et Mercure (Hg). Source : Chormare et Kumar (2022)	26
Figure 7 : Bilan des effets du cadmium connus sur le système immunitaire d'après les données de Marth <i>et al.</i> , 2001 ; Pathak et Khandelwal, 2008 ; Chen <i>et al.</i> , 2013 ; Djokic <i>et al.</i> , 2014 ; Zhang <i>et al.</i> , 2016 ; Jin <i>et al.</i> , 2016 ; Alkharashi <i>et al.</i> , 2017 ; Kulas <i>et al.</i> , 2019 ; Mirkov <i>et al.</i> , 2021.....	28
Figure 8 : Décroissance des concentrations en IFN γ de la voie Th1 sans altération des cytokines IL-4 et IL-13 de la voie Th2 selon un gradient et un temps d'exposition des cellules <i>in vitro</i> à l'arsenic. Source : Morzadec <i>et al.</i> , 2012.....	30
Figure 9 : Bilan des effets connus sur le système immunitaire d'une exposition à l'arsenic. Inspiré de Dangleben <i>et al.</i> , 2013	31
Figure 10 : Courbe montrant le lien entre l'utilisation de plomb dans le pétrole (courbe pleine) et le niveau de plomb sanguin (courbe en pointillé) chez l'humain en fonction des années d'après Järup, 2003.....	32
Figure 11 : Bilan des effets du plomb sur le système immunitaire. Modifié d'après Dietert et Piepenbrink, 2006 ; Vallverdú-Coll <i>et al.</i> , 2019	34
Figure 12 : Mécanismes connus d'induction de l'auto-immunité par le mercure inorganique chez les souris, d'après Pollard <i>et al.</i> , 2019	37
Figure 13 : Bilan des effets sur le système immunitaire des mammifères marins des polluants aquatiques (principalement le PCB mais aussi les PBDE, les métaux lourds notamment le mercure et les composés perfluorés), d'après Desforges <i>et al.</i> , 2016	40
Figure 14 : Schéma expliquant le principe de la fracturation hydraulique. Source : Singh, 2019....	43
Figure 15 : Densité des plastiques selon leurs différentes tailles autour du globe d'après Eriksen <i>et al.</i> , 2014	45

Figure 16 : Composition chimiques des PM _{2,5} mesurées à la station de Paris 1 ^{er} les bains en 2021, modifié d'après Airparif, 2022	47
Figure 17 : Mécanismes de formations de l'ozone troposphérique, polluant de l'air d'intérêt majeur en santé publique. Modifié d'après Zhang <i>et al.</i> (2019)	50
Figure 18 : Les différents courants de fumée émis par une cigarette à l'origine du tabagisme passif (Schéma personnel)	51
Figure 19 : Marqueurs de l'inflammation dans les voies respiratoires de souris exposées à de la fumée de cigarette 5 jours par semaine pendant 4 semaines pour l'exposition « sub acute » et 24 semaines pour l'exposition chronique. D'après Wang <i>et al.</i> , 2012.	56
Figure 20 : Comparaison du nombre de neutrophiles, lymphocytes et de la quantité d'ARNm IL-6 dans le sang de jeunes singes de 6 mois avant et après 2 semaines d'exposition à de la fumée de cigarette, d'après Wang <i>et al.</i> , 2007	57
Figure 21 : Image et schéma du gradient de Ficoll obtenu après centrifugation inspiré d'après Bøyum, 1976.....	63
Figure 22 : Représentation schématique du fonctionnement d'un cytomètre de flux comprenant les trois faisceaux lumineux éclairant une cellule. Source : Givan, 2001	65
Figure 23 : Marquage des cellules selon les différents mélanges d'anticorps réalisés	68
Figure 24 : Répartition des différentes cellules au sein du cytogramme sans gating	69
Figure 25 : Stratégies de <i>gating</i> pour chaque marquage, inspiré d'après Colombe, 2020	70
Figure 26 : Principe de la méthode d'ELISA sandwich avec une détection par le complexe streptavidine/biotine. Modifié d'après Creative Biolabs (2023).....	71
Figure 27 : Plaques 96 puits après dépôts des différents échantillons de plasma en duplicats.....	72
Figure 28 : Représentation graphique de la distribution des données de LT et TNF α autour d'une loi normale.	74
Figure 29 : Cytogrammes permettant la lecture des différents pourcentages cellulaires pour chaque marquage, exemple du chien 3.	76
Figure 30 : Diagramme en boîtes des valeurs de monocytes établies par cytométrie de flux chez les chiens « non exposés » (noté 0) et les chiens « exposés » (noté 1) avec en A les % sur l'échantillon global, en B les % sur les femelles et en C les % sur les mâles.	78
Figure 31 : Diagramme en boîtes des valeurs de monocytes immatures (CD11b+ MHCII-CD14+) établies par cytométrie de flux chez les chiens « non exposés » (noté 0) et les chiens « exposés » (noté 1) avec en A les % sur l'échantillon global, en B les % sur les femelles et en C les % sur les mâles.	79
Figure 32 : Diagramme en boîtes des valeurs de LT CD4+ CD8+ double positif établis par cytométrie de flux chez les chiens mâles « non exposés » (noté 0) et les chiens mâles « exposés » (noté 1).	80

Figure 33 : Courbes de régression obtenues par étalonnage sur le logiciel GraphPad PRISM pour le deuxième essai d'IL-6 à gauche et pour TNF α à droite.....	81
Figure 34 : Courbe d'étalonnage par régression polynomiale quadratique pour la cotinine plasmatique.....	82
Figure 35 : Comparaison entre un marquage « Mix 3 » ne présentant pas d'artefact (A) et présentant un artefact (B) nuisant à la mesure du pourcentage de monocytes matures parmi les cellules CD11b+.....	86

Liste des tableaux

Tableau 1 : Synthèse de quelques études portant sur l'utilisation des animaux en guise de sentinelles pour étudier l'impact de la pollution sur la santé	24
Tableau 2 : Effets des différentes formes de mercure sur le système immunitaire d'après Havarinasab et Hultman (2005).....	36
Tableau 3 : Impacts sur la santé du tabagisme passif associés à l'exposition des adultes et enfants, modifié d'après Board, 2005.....	53
Tableau 4 : Récepteurs spécifiques des leucocytes associés utilisés au sein de cette étude d'après Aniołek <i>et al.</i> , 2014 ; Riondato et Comazzi, 2021 ; Weiss et Wardrop, 2010.....	66
Tableau 5 : Données chiffrées sur les deux cohortes de l'étude	75
Tableau 6 : Données statistiques des cellules sanguines mesurées lors de la NFS	76
Tableau 7 : Données statistiques des différents marquages en cytométrie de flux	77
Tableau 8 : Données statistiques des mesures de cytokines IL-6 et TNF α	81
Tableau 9 : Données statistiques des mesures de cotinine plasmatique	83
Tableau 10 : Comparaison des valeurs médianes de chaque paramètre de la NFS obtenues sur les deux groupes de l'étude avec les valeurs de référence établies dans l'étude de Bourgès-Abella <i>et al.</i> (2015).....	84
Tableau 11 : Comparaison des moyennes obtenues lors de cette étude par rapport à la littérature pour les valeurs de littérature sur des chiens sains adultes	87
Tableau 12 : Comparaison des valeurs de cytokines obtenues par ELISA sur cette étude et celle de Calvalido <i>et al.</i> , 2016.....	89
Tableau 13 : Données d'inclusion dans l'étude.....	120
Tableau 14 : Données de NFS.....	122
Tableau 15 : Données de cytométrie de flux pour le « Mix 1 » donnant le phénotype des lymphocytes.....	124
Tableau 16 : Données de cytométrie de flux pour le « Mix 2 » donnant le phénotype des lymphocytes T.....	125
Tableau 17 : Données de cytométrie de flux pour le « Mix 3 » donnant le phénotype des cellules myéloïdes.....	126
Tableau 18 : Données des ELISA IL-6 et TNF α	127
Tableau 19 : Données de l'ELISA cotinine	128
Tableau 20 : Résultats statistiques de NFS selon le sexe des chiens.....	129

Tableau 21 : Résultats statistiques des ELISA IL-6 et TNF α selon le sexe des chiens129

Liste des abréviations

AA = Acide arachidonique

AAN = Anticorps anti-nucléaire

Ac = Anticorps

AFA = Anticorps anti-fibrillarine

Ag = Antigène

AhR = Récepteur aryl hydrocarbon

ANSES = Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARNm = Acide ribonucléique messenger

As = Arsenic

AVC = Accident vasculaire cérébrale

BCR = B cell receptor = Récepteur des lymphocytes B

BPA = Bisphénol A

BPCO = Bronchopneumopathie obstructive chronique

BSA = Bovin serum albumine = Albumine de sérum bovin

Cd = Cadmium

CD = Cellule dendritique

CDX = Cluster de différenciation n°X

CMH = Complexe majeur d'histocompatibilité

CO = Monoxyde de carbone

ComERC = Comité d'éthique pour la recherche clinique

CPA = Cellule présentatrice d'antigène

Cpg = Cigarette par jour

Cr = Chrome

CRP = Protéine C réactive

CSF-1 = Facteur de stimulation hématopoïétique

Cu = Cuivre

DDT = Dichlorodiphényltrichloroéthane

DMSO = Diméthylsulfoxyde

DO = Densité optique

EDTA = Acide éthylène diamine tétra-acétique

EFSA = Autorité européenne de sécurité des aliments

ELISA = Enzyme-linked Immuno Assay = Immunoabsorption par enzyme liée

ENVA = Ecole nationale vétérinaire d'Alfort

ERX = Récepteurs aux œstrogènes

EVALI = E-cigarette or vaping associated lung injury = Pneumopathie associée à la cigarette électronique

FITC = Isothiocyanate de fluorescéine

GB = Globule blanc

GR = Globule rouge

H0 = Hypothèse nulle

H2 = Histocompatibilité 2

Hg = Mercure

IARC = Centre international de recherche sur le cancer

IC = Immuns-complexe

IFN = Interféron

IgX = Immunoglobuline de type X

IL-X = Interleukine numéro X

INBIFO = Institut für Biologische Forschung

LB = Lymphocyte B

Lck = Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase = Enzyme kinase spécifique des lymphocytes

LPS = Lipopolysaccharide

LT = Lymphocyte T

LT DN = Lymphocyte T double négatif

LT DP = Lymphocyte T double positif

LTCD4 = Lymphocyte T cluster de différenciation 4

LTCD8 = Lymphocyte T cluster de différenciation 8

LTreg = Lymphocyte T régulateur

MDSC = Myeloid derived suppressor cell = Cellule myéloïde suppressive

MGG = May-Grünwald Giemsa

MSIN = Mort subite inexplicée du nourrisson

NFS = Numération formule sanguine

NK = Natural killer

NL = Nœud lymphatique

NO = Monoxyde d'azote

O3 = Ozone

OMS = Organisation mondiale de la santé

PAH = Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Pb = Plomb

PBB = Polybromobiphényles

PBDE = Diphényléthers polybromés

PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cell = Cellule mononuclée du sang périphérique

PBS = Tampon phosphate salin

PCB = Polychlorobiphényles

PFA = Paraformaldéhyde

PGE2 et PGI2 = Prostaglandines

pH = potentiel hydrogène

PM = Particulate matter = Particules en suspension

PNB = polynucléaire basophile

PNE = polynucléaire éosinophile

PNN = polynucléaire neutrophile

POP = Polluant organique persistant

PSM = Poste de sécurité microbiologique

PVC = Polyvinylchloride

qPCR = Réaction de polymérase en chaine quantitative

ROI = Dérivés réactifs de l'oxygène

R-PE = R- phycoérythrine

Rpm = Rotation par minute

SD = Standard deviation = Ecart-type

SI = Système immunitaire

SVF = Sérum de veau foetal

TCDD = Dioxine = 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin

ThX = T helper numéro X

TLR = Toll like receptor

TNF = Tumor necrosis factor = Facteur de nécrose tumorale

UE = Union Européenne

UFPM = Particules en suspension ultrafines

UV = Ultraviolet

WHO = World Health Organization

$\alpha 7$ nAChR = Récepteur $\alpha 7$ -acétylcholine

Introduction

La pollution est un sujet qui entraîne de plus en plus de recherches en raison de son impact sur la vie des êtres humains et sur la biodiversité. Ce terme général regroupe de nombreux polluants qui peuvent se trouver aussi bien dans le sol que dans l'eau ou l'air. Certains sont d'origine naturelle mais utilisés par l'industrie humaine et rejetés en quantité trop importante dans la nature. C'est, par exemple, le cas des métaux lourds. Cela engendre souvent des concentrations qui deviennent toxiques pour les êtres vivants. D'autres polluants sont des matériaux ou principes actifs que l'humain a créé, produit, utilise et rejette dans la nature comme par exemple les pesticides ou les plastiques. Enfin, un autre type de pollution se trouve dans des catastrophes naturelles telles que des feux de forêt. Ces feux, dont la combustion est à l'origine de nombreux composés chimiques toxiques, voient leur fréquence et leur intensité en constante augmentation du fait du réchauffement climatique (Hurteau *et al.*, 2014).

Par la suite, tous ces composés polluants se retrouvent ainsi dans la nature au sein de l'eau mais aussi dans l'alimentation. Cela engendre des problèmes sanitaires notamment dans des pays en voie de développement où l'industrie est massive et les conditions de vie ne permettent une hygiène suffisante pour les populations (World Health Organization, 2022). Cependant, il n'y a pas que l'humain qui est touché par ces polluants, les animaux aussi. Les animaux sauvages sont le premier lieu de mécanismes de stockage de composés qui subissent souvent une faible dégradation biologique et persistent très longtemps dans la nature. Ces polluants sont nommés polluants organiques persistants. Ainsi, par exemple, les animaux marins sont le lieu de bioaccumulation, mécanisme par lequel ces composés sont stockés dans les tissus animaux suite à leur ingestion, les rendant alors susceptibles de développer des maladies nuisant à leur reproduction (Beineke *et al.*, 2005).

De nombreuses études montrent de plus en plus que la pollution est à l'origine de cancers et de maladies auto-immunitaires délétères pour l'humain. Cela est lié à l'impact que ces polluants peuvent avoir sur le système immunitaire. En effet, ils modifient les réponses normales du système immunitaire en déséquilibrant des balances de cellules immunitaires et des concentrations de médiateurs chimiques. Cela entraîne une baisse des défenses immunitaires contre les cellules cancéreuses favorisant alors le développement de tumeurs ou contre les maladies infectieuses. Une exacerbation non contrôlée de certains mécanismes immunitaires peut aussi avoir lieu impliquant alors des maladies auto-immunitaires souvent graves. Chez l'humain, l'impact des différents polluants tels que le bisphénol A ou certains métaux lourds sont bien connus maintenant et ont permis de diminuer l'exposition humaine avec, par exemple, la diminution d'utilisation du plomb dans les carburants ou l'apparition des plastiques sans bisphénol A (Järup, 2003). Cependant, chez l'animal, l'impact exact de ces polluants est bien moins documenté. Leur étude est souvent complexe en raison d'une maîtrise difficile de l'exposition, en particulier sur des animaux sauvages, qui peuvent être exposés à de nombreux polluants à la fois. Ainsi, l'impact exact d'un composé précis est complexe à estimer dans la nature et bien plus simple à étudier en laboratoire. Cet impact est pourtant bien existant et engendre sur les animaux sauvages une sensibilité accrue aux maladies notamment infectieuse qui entraîne une diminution de leur reproduction et donc une diminution du nombre d'individus de l'espèce concerné (Desforges *et al.*, 2016). Plusieurs polluants ont aussi un impact sur le développement des fœtus et des jeunes entraînant des affections pouvant aller

jusqu'au décès de l'animal (Black *et al.*, 2017 ; Kennedy *et al.*, 2021 ; Saravia *et al.*, 2014). La biodiversité peut donc pâtir de la pollution et notamment sur des espèces en voie d'extinction tels que l'ours polaire par exemple. Cependant, l'étude de ces animaux sauvages, ou même domestiques, peut permettre une meilleure compréhension de l'exposition de l'humain. Les chiens ont par exemple été utilisés pour mieux comprendre l'exposition de l'humain aux polluants de la vie citadine se trouvant principalement dans l'air et l'eau (Backer *et al.*, 2001 ; Reif et Cohen, 1970). Les animaux sauvages tels que les oiseaux ou les mammifères marins permettent aussi de mieux étudier la prévalence des polluants et leur impact (Beineke *et al.*, 2005 ; Vermeulen *et al.*, 2015).

Un autre polluant à l'échelle du domicile est le tabac. S'il est connu que le tabac provoque des cancers et maladie pulmonaire chronique chez l'humain, l'impact sur les animaux domestiques vivant avec les fumeurs est moins connu. Cette fumée de tabac a cependant déjà montré plusieurs impacts notables sur leur santé. Un lien entre l'expression exacerbée de la dermatite atopique, maladie de peau résultant d'un trouble de la barrière cutané et d'une dysrégulation immunitaire, et l'exposition au tabagisme passif a été établi chez le chien (Ka, 2011). De plus, plusieurs études ont montré une inflammation pulmonaire importante chez le chien et le chat de laboratoire exposés au tabagisme passif (Abrams *et al.*, 1988 ; Kolahian *et al.*, 2014 ; Park *et al.*, 1977 ; Yamaya *et al.*, 1989). Cette inflammation peut favoriser des maladies déjà connues chez nos animaux domestiques telles que l'asthme félin ou la bronchite chronique obstructive chez le chien. Au niveau local, la pollution par le tabagisme passif peut donc engendrer des modifications délétères du système immunitaire chez les animaux. Cependant, l'impact sur l'organisme en général est bien moins connu. Ainsi, cette thèse permettra une étude de l'impact systémique du tabagisme passif sur le système immunitaire en explorant les composantes innées et adaptatives de celui-ci sur des chiens adultes sains. L'objectif de ce travail était de mettre en évidence des éventuelles modifications du système immunitaire pouvant favoriser des maladies systémiques dysimmunitaires ou l'apparition de cancers liés au tabagisme passif chez le chien.

Afin de mieux comprendre les effets déjà décrits dans la littérature des différents polluants sur le système immunitaire (SI), la première partie de ce manuscrit détaillera tout d'abord les différents acteurs cellulaires et moléculaires du SI, pour ensuite faire un état de l'art des connaissances acquises sur l'impact des polluants sur ces nombreux acteurs. La partie expérimentale de ce manuscrit, à la suite de cette première partie introductive, se concentrera sur les effets du tabagisme passif sur le système immunitaire des chiens, notamment sur les cytokines pro-inflammatoires et sur les différentes populations leucocytaires sanguines.

Première partie

I. Rappels sur le système immunitaire

Les êtres vivants, animaux comme plantes, sont soumis à de nombreuses agressions provenant du milieu extérieur. Chez les êtres vivants, le développement d'un système immunitaire permettant de se défendre efficacement contre ses agressions externes est essentiel. Les pathogènes et particules étrangères à l'organisme sont composés d'antigènes (Ag), molécules qui peuvent être reconnues et déclenchent la mise en place d'une réponse de l'organisme par le biais du système immunitaire. Chez les mammifères, ce système est composé de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. L'immunité innée est la première ligne de défense de l'organisme, lorsque celle-ci est dépassée, la réponse immunitaire adaptative se met alors en place. Ces deux parties de la réponse immunitaire sont étroitement liées, et font intervenir des acteurs moléculaires et cellulaires, figure 1, qui seront détaillés dans les parties suivantes.

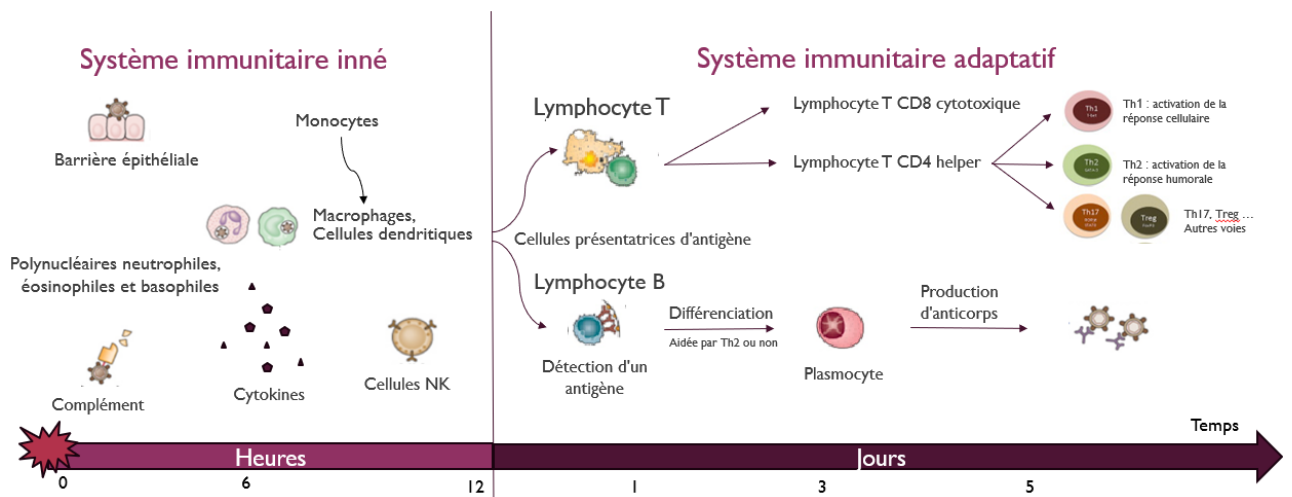


Figure 1 : Séparation temporelle et principaux acteurs cellulaires et moléculaires mis en jeu dans les deux immunités innée et adaptative. Modifié d'après Abbas et Lichtman (2008), Bonilla et Oettgen, (2010), Parkin et Cohen (2001)

1. Immunité innée

Il s'agit de la première ligne de défense permettant de protéger le corps des agressions externes. Un des premiers acteurs de cette immunité se trouve être les barrières naturelles du corps vers l'extérieur : tégument, muqueuses... Ces barrières sont composées de cellules jointives empêchant la pénétration de pathogènes. Une protection chimique est également assurée d'une part par le maintien d'un pH acide limitant le développement des micro-organismes, et d'une autre par la production de médiateurs chimiques anti-microbiens. En cas de brèche dans ces barrières, les acteurs cellulaires et moléculaires de l'immunité innée sont les premiers à réagir.

L'immunité innée est classiquement considérée comme « aspécifique » car les cellules mises en jeu ne sont pas spécifiques du pathogène rencontré. Cependant, cette vision est à relativiser depuis la découverte dans les années 2000 de récepteurs appelés « Toll-Like » (TLR) sur la surface des cellules de l'immunité innée. Cette découverte de la valence antimicrobienne des TLR a été

premièrement menée par Jules Hoffmann en 1996 sur des mouches drosophiles (Lemaitre *et al.*, 1996) et a permis par la suite l'identification de nombreux TLR. Le premier identifié est le TLR 4, récepteur aux lipopolysaccharides (LPS) bactérien, découvert par Beutler en 1998 (Poltorak *et al.*, 1998). Ces découvertes leur ont permis l'obtention du prix Nobel de physiologie et médecine en 2011. Les années suivants ces découvertes, plusieurs TLR ont été décrit avec chacun un ligand spécifique permettant la reconnaissance de bactéries et de virus. Ainsi, ces derniers permettent d'identifier la nature de l'agent pathogène (virus, bactérie et quel sous type de bactérie) et ainsi d'adapter la réponse immunitaire à apporter (Weiss et O'Neill, 2022).

A. Les cellules mises en jeu dans l'immunité innée

Il existe plusieurs types cellulaires impliqués dans le système immunitaire inné. Ces cellules sont majoritairement des granulocytes (polynucléaires, macrophages, cellules dendritiques) ayant différents rôles et sont plus ou moins spécialisés dans leurs actions. Certains possèdent la capacité de phagocytose, qui permet l'internalisation puis la dégradation des pathogènes.

a. Polynucléaires

Les polynucléaires sont des cellules circulant dans le sang ayant la capacité de traverser la paroi des vaisseaux sanguins pour atteindre les tissus les nécessitant. Cette action se nomme la diapédèse. Ils possèdent un noyau plurilobé et des granulations cytoplasmiques. Il existe différents types de polynucléaires selon le type de granulations :

- Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont les leucocytes les plus nombreux dans le sang. Ils possèdent une grande capacité de phagocytose et leur dégénérescence est à l'origine du pus.
- Les polynucléaires éosinophiles (PNE) sont en nombre plus limité dans le sang et les tissus. Ils possèdent des granulations éosinophiles, roses à la coloration cytologique standard May-Grünwald Giemsa (MGG), très visibles à l'examen microscopique. Ils exercent un rôle majeur dans l'immunité antiparasitaire et les allergies.
- Les polynucléaires basophiles (PNB) sont en très faible nombre dans la circulation sanguine. Ils possèdent des granulations fortement basophiles, violettes à la coloration MGG. Ils sont surtout impliqués dans les réactions allergiques.

b. Phagocytes mononucléés

Les phagocytes mononucléés de l'immunité innée regroupent différentes cellules que sont les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Les macrophages et les cellules dendritiques se situent dans les tissus en grande majorité. Les monocytes sont les formes immatures de ces cellules, présents dans le sang. Ils proviennent de précurseurs de la moelle osseuse et circulent dans le sang en attendant un signal inflammatoire de l'organisme. Lorsqu'une réponse inflammatoire est lancée par l'organisme, les médiateurs chimiques mis en jeu localement vont entraîner la diapédèse des monocytes sanguins qui vont alors se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques selon les molécules locales qu'ils rencontrent (Weiss et Wardrop, 2010).

Les macrophages sont des cellules de grande taille présentes en tant que sentinelles dans les tissus et prêtes à réagir dès la détection d'un pathogène. Ils se situent en quantité importante dans les tissus les plus propices au contact avec l'extérieur comme par exemple les poumons (macrophages alvéolaires), le foie (cellule de Kupffer) ou le tissu conjonctif (histiocytes). Ils se

trouvent par ailleurs dans d'autres tissus sensibles tels que les tissus osseux (ostéoclastes) mais aussi dans la moelle osseuse ou le tissu nerveux (microgliocytes). Les macrophages ont des capacités de phagocytose mais aussi de recrutement cellulaire et de présentation d'antigènes. Ils sont renouvelés localement par leur forme immature circulant dans le sang, les monocytes, ou par division pour les macrophages spécialisés des tissus comme les cellules de Kupffer ou les microgliocytes nerveux (Weiss et Wardrop, 2010). Ceux-ci changent de morphologie lors de leur extravasation sanguine pour permettre la fonction de phagocytose. Les macrophages possèdent des récepteurs TLR qui leur permettent d'avoir un début de spécialisation dans la gestion des pathogènes. Ils servent aussi à la cicatrisation et à la gestion des « déchets » du corps en phagocytant les hématies, le fer, etc... (Franken *et al.*, 2016)

Les cellules dendritiques présentent, elles aussi, des capacités de phagocytose des agents microbiens qu'elles rencontrent dans les tissus. Il existe plusieurs types de cellules dendritiques (CD) : les CD dites inflammatoires, les CD régulatrices et enfin les cellules de Langerhans situées dans l'épiderme. Les CD inflammatoires possèdent un rôle clé dans la réponse immunitaire car elles font le lien entre la réponse immunitaire innée et adaptative. Ces cellules peuvent stimuler l'inflammation locale en détectant le pathogène et en attirant localement les neutrophiles et monocytes depuis le sang. Elles vont aussi présenter l'antigène rencontré aux cellules de l'immunité adaptative et ainsi permettre la mise en place de l'immunité adaptative, plus spécifique (Balan *et al.*, 2019). Les CD régulatrices vont permettre, quant à elle, d'éviter un emballement du système immunitaire qui peut provoquer des lésions de l'organisme si celui-ci n'est pas inhibé. Pour cela, elles activent des voies spécifiques de l'immunité qui effectuent un rétrocontrôle négatif sur les voies de stimulation de la réponse inflammatoire avec notamment la production d'une cytokine nommée IL-10 et l'activation d'une voie lymphocytaire détaillée par la suite, les lymphocytes T régulateurs (Weiss et Wardrop, 2010). Enfin, les cellules de Langerhans sont des CD spécifiques de l'épiderme. Elles s'y trouvent comme sentinelles et permettent l'activation de la réponse inflammatoire locale innée et adaptative en cas de brèche cutanée par exemple. Ces cellules de Langerhans se trouvent aussi dans certaines muqueuses (Romani *et al.*, 2010).

c. Autres cellules

D'autres cellules sont mises en jeu dans l'immunité innée. Les mastocytes, situés dans les tissus, sont capables de libérer des facteurs locaux, tels que l'histamine, impliquée dans les processus de cicatrisations et les réactions allergiques. Les cellules natural killer (NK), quant à elles, sont des leucocytes particuliers notamment capable de déclencher la lyse de cellules tumorales ou de cellules atteintes par un pathogène, souvent d'origine virale.

B. Médiateurs chimiques et humoraux

L'action des différentes cellules décrites ci-dessus est complétée par des médiateurs solubles. Ces médiateurs permettent la communication entre les cellules ainsi que la potentialisation de leurs actions. Du fait de leur diversité, seuls les médiateurs solubles d'intérêt pour notre étude sont détaillés ici.

a. Complément

Le complément est un ensemble de protéines plasmatiques qui a un rôle majeur dans la réponse immunitaire. Il intervient en première ligne quand un antigène est reconnu localement par un anticorps (Ac) pouvant fixer ce complément. Lors de cette reconnaissance, plusieurs actions

peuvent avoir lieu avec notamment une lyse (destruction) cellulaire, une aide à la phagocytose et un rôle pro-inflammatoire de recrutement des cellules immunitaires sanguines.

b. Cytokines

Les cytokines sont des protéines qui permettent aux cellules immunitaires de communiquer entre elles. Les réponses innée et adaptative impliquent chacune des cytokines et récepteurs spécifiques. Les cytokines importantes de l'immunité innée sont l'interleukine 1 (IL-1), l'interleukine 6 (IL-6), le *tumor necrosis factor* (TNF α) et les interférons (IFN). Chacune de ces cytokines a des actions spécifiques et des interactions plus ou moins complexes avec les différentes cellules en jeu.

- L'IL-1 est produite par les macrophages et a une action pro-inflammatoire. C'est un pyrogène endogène, c'est-à-dire qu'elle provoque de la fièvre. Elle inhibe la croissance bactérienne et bloque la multiplication des virus. Elle augmente aussi l'action des IFN et le taux de protéine C réactive (CRP), protéine de l'inflammation permettant l'activation du complément et augmentant la phagocytose.
- L'IL-6 est une cytokine avec une action pro-inflammatoire qui est aussi impliquée dans la régulation de l'hématopoïèse, production des globules rouges par la moelle osseuse. Il a été montré chez l'humain que lorsque des perturbations dans la signalisation de cette cytokine existent, cela favorise des maladies telles que la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, l'ostéoporose, la sclérose en plaques ou encore certains cancers tel le myélome multiple ou le cancer de la prostate (Heinrich *et al.*, 2003).
- Le TNF α a aussi une action pro-inflammatoire en tant que pyrogène endogène, en augmentant le taux de CRP et en stimulant les polynucléaires. Il a un rôle majeur dans la prise en charge des cellules tumorales en permettant leur lyse. Il va aussi être activateur des cellules d'origine lymphoïde mise en jeu dans l'immunité adaptative.
- Les IFN quant à eux sont divisés en plusieurs familles qui ont chacune des actions plus ou moins immunomodulatrices, antivirale et anti tumorale.

2. Immunité adaptative

Lorsque l'immunité innée n'arrive plus à faire face au pathogène, les macrophages et cellules dendritiques présentes dans le tissu lésé, déclenchent la réponse immunitaire adaptative. Pour ce faire, ces derniers présentent des morceaux du pathogène, appelés peptides antigéniques, aux cellules de l'immunité adaptative, les lymphocytes, afin d'éliminer le pathogène de façon adaptée et efficace. Les macrophages et les cellules dendritiques sont donc appelés « cellules présentatrices d'antigène » ou CPA. Ces CPA font donc le lien entre l'immunité innée et adaptative. L'immunité adaptative repose sur une sélection des lymphocytes sur la base des séquences de gènes codant pour les récepteurs s'adaptant au mieux à l'antigène (Ag) présenté (Bonilla et Oettgen, 2010). Cette immunité se divise en deux branches, plus ou moins liées entre elles : l'immunité cellulaire mettant en jeu des cellules cytotoxiques, et l'immunité humorale dont l'acteur principal est l'anticorps.

A. Déclenchement de la réponse immunitaire adaptative par les cellules présentatrices d'antigènes

Les macrophages et les CD, présents dans le tissu infecté et inflammatoire, captent puis dégradent le pathogène en partie pour le présenter sous forme de peptides antigéniques aux autres cellules impliquées dans l'immunité adaptative. Ce processus est nommé « présentation antigénique » et se

fait via des molécules appelées complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Il existe deux classes de CMH (voir figure 2) :

- Les CMH de classe I permettent la présentation d'un peptide dit endogène. La voie de présentation de l'antigène sur ce récepteur comprend la dégradation intracellulaire du pathogène par le protéasome (appareil cellulaire permettant la destruction des protéines cellulaires) et la présentation d'un des peptides issus de cette dégradation. Il s'agit donc souvent de pathogène intracellulaire.
- Les CMH de classe II permettent la présentation d'un antigène exogène phagocyté par la CPA. Il concerne donc les pathogènes plutôt extracellulaires (Albert, 2017).

La dégradation de l'antigène et son association sous forme de peptide antigénique avec le CMH I ou II, se fait de façon concomitante avec la migration des CPA vers les nœuds lymphatiques, lieu de concentration des cellules de l'immunité adaptative : les lymphocytes (Bonilla et Oettgen, 2010). C'est dans les nœuds lymphatiques que la reconnaissance de l'antigène puis la différenciation et la multiplication des lymphocytes a lieu. Il existe différents types de lymphocytes stimulables par la CPA et dont les actions pour éliminer le pathogène rencontré sont différentes.

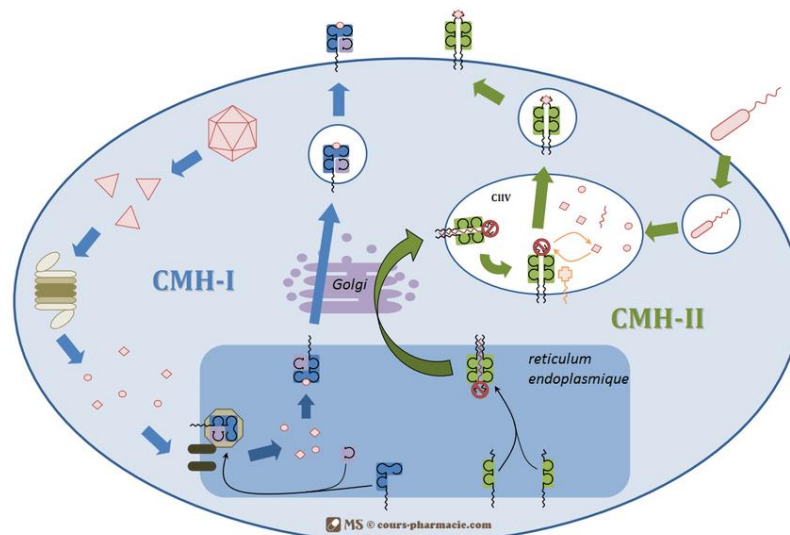


Figure 2 : Mise en place des différents complexes présentateurs d'antigènes au sein des cellules d'après Albert, 2017

B. Lymphocytes T

Les lymphocytes T (LT) sont des cellules lymphoïdes produites par la moelle osseuse dont la maturation a lieu dans le thymus. Les LT sont impliqués dans l'immunité adaptative dite cellulaire. Ils sont caractérisés par la présence d'un récepteur CD3 sur leur membrane et se séparent en deux groupes selon un autre récepteur exprimé : les lymphocytes T CD4+ (LTCD4) dit lymphocytes T *helper* ou auxiliaires et les lymphocytes T CD8+ (LTCD8) dit lymphocytes cytotoxiques.

Lorsqu'un LTCD4 naïf (nommé Th0 par la suite) rencontre un antigène exprimé sur un CMH de classe II, les cytokines sécrétées par la CPA induisent une différenciation en différents LTCD4+ effecteurs qui sécrètent chacun des cytokines spécifiques (voir figure 3). Les principales voies de lymphocytes T *helper* mises en jeu dans l'immunité adaptative sont les voies Th1 et Th2.

La voie Th1 est déclenchée par la sécrétion d'IFN γ et d'IL-2 par les LTCD4. Ces cellules ont pour rôle d'aider à la différenciation des LTCD8 en LT cytotoxiques ainsi que d'activer les macrophages sur le lieu de l'inflammation pour augmenter leur capacité de phagocytose et d'élimination des cellules infectées. Cette voie permet aussi d'activer les cellules NK, participant ainsi à l'élimination des cellules infectées (Bonilla et Oettgen, 2010). Il s'agit d'une voie de stimulation de l'immunité cellulaire.

La voie Th2 entraîne quant à elle, la sécrétion d'IL-4, IL-10, IL-5 et IL-13 stimulant la voie de l'immunité humorale en aidant à la différenciation des lymphocytes B dont le rôle sera détaillé ci-après. Ils existent d'autres voies dont les rôles au sein du système immunitaire sont importants. La voie des LT régulateurs (LTreg) permet une régulation de la réponse immunitaire par une action anti-inflammatoire et permet de l'inhiber lorsque son action n'est plus nécessaire. Enfin, la voie des LT Th17 exerce un effet pro-inflammatoire, parfois délétère, car souvent impliqué lors des maladies auto-immunitaires (Bonilla et Oettgen, 2010).

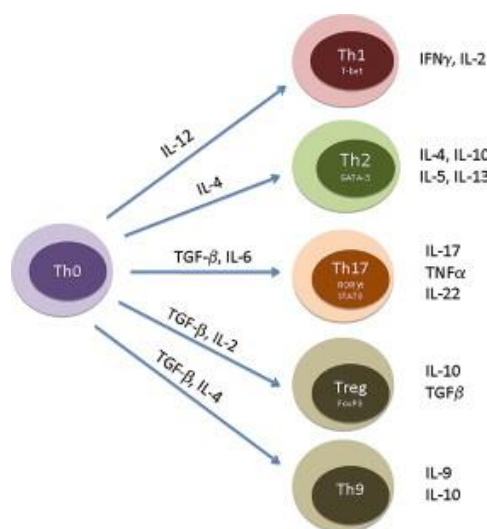


Figure 3 : Les différentes voies de différenciation des LTCD4 selon les cytokines présentes dans leur milieu et les cytokines qu'elles produisent respectivement Source : Bonilla et Oettgen, 2010

Les LTCD8, activés par le LT de type Th1 via les cytokines produites, se différencient en LT cytotoxiques. Cependant, afin d'être capables d'éliminer la bonne cible cellulaire, ils doivent être également activés par la présentation de peptides antigénique issu du pathogène intracellulaire, associés au CMH de classe I. Ainsi, une fois activé et devenu cytotoxique, le LTCD8 retourne sur le lieu de l'infection pour reconnaître puis éliminer les cellules infectées en induisant leur apoptose, mécanisme de mort cellulaire.

C. Lymphocytes B

Les lymphocytes B (LB) sont produits et mûrent dans la moelle osseuse puis migrent dans les nœuds lymphatiques où ils attendent d'être mis en présence d'un antigène. Ils font partie de la voie de l'immunité adaptative dite immunité humorale car ce sont les seules cellules capables de produire des anticorps spécifiques de l'antigène en question.

Il existe deux mécanismes d'activation des LB, dépendants ou non de l'aide du LTCD4. Pour la voie indépendante, lors de la rencontre avec l'antigène, le LB naïf le reconnaissant le mieux, c'est-à-dire ayant la meilleure affinité, se différencie et devient un plasmocyte, cellule spécialisée produisant des anticorps spécifiques appelés immunoglobulines M (IgM) d'affinité et de spécificité moyennes (Mäkelä *et al.*, 1970).

Lors de la voie dépendante des LT, le LB rencontre l'antigène sous sa forme native, grâce à son IgM de surface (également appelée B Cell Receptor ou BCR) et le présente sur son CMH de classe II. Les LB sont aussi des CPA. En parallèle, le LTCD4 reconnaît lui aussi l'antigène *via* une autre CPA (macrophages ou cellule dendritique) et se différencie en LTCD4 Th2, si le pathogène est extracellulaire. Les deux cellules se rejoignent et se reconnaissent par le biais du CMH de classe II du LB exposant l'antigène. Le LTCD4 Th2 induit la différenciation du LB en plasmocyte produisant un type d'anticorps particuliers encore plus spécifique de l'antigène et en quantité très importante, les immunoglobulines G (IgG).

Les anticorps produits circulent dans le sang et se fixent sur les antigènes qu'ils reconnaissent. Selon l'antigène, cette fixation peut avoir lieu sur des pathogènes extracellulaires (bactéries, parasites...) ou des cellules infectées présentant l'antigène à sa surface. Les autres cellules du système immunitaire capables de reconnaître les anticorps (macrophages, cellules NK, granulocytes...) se chargent de détruire la cellule infectée ou le pathogène, recouvert d'anticorps, par phagocytose ou induction de l'apoptose cellulaire. Ainsi, les anticorps permettent de favoriser l'élimination de l'antigène en marquant sa présence pour les autres cellules du système immunitaire.

D. La mémoire immunitaire

La mise en place d'une mémoire immunitaire est un mécanisme spécifique à l'immunité adaptative. Lors de la différenciation des différents lymphocytes, une partie de ces lymphocytes sélectionnés sont conservés de façon à garder en mémoire l'antigène rencontré par l'organisme.

- Dans le cas des LT, une partie des LTCD4 et LTCD8 différenciés deviennent des lymphocytes mémoires. Ils seront alors localisés selon leurs récepteurs soit dans les tissus périphériques soit dans les nœuds lymphatiques (Jameson et Masopust, 2018).
- Dans le cas des LB, ce sont les plasmocytes qui restent en mémoire. Les plasmocytes issus d'une stimulation non LT-dépendante ont une durée de vie courte, d'environ deux jours dans le sang. A l'inverse, les plasmocytes issus d'une stimulation LT dépendante, restent en mémoire dans la moelle osseuse hématopoïétique et produisent des anticorps à un niveau basal continu dans le sang.

Cette mémoire immunitaire permet une action plus rapide du système immunitaire lors d'une nouvelle rencontre avec l'antigène gardé en mémoire. Cette action est non seulement plus rapide, mais aussi plus intense, ce qui permet de stopper très rapidement la propagation d'un pathogène.

E. Bilan sur l'immunité adaptative

L'immunité adaptative est donc un ensemble de cellules et de molécules communiquant entre elles pour répondre au mieux à l'agression et l'éliminer le plus efficacement possible (voir figure 4). Ces échanges sont complexes et grandement étudiés notamment pour la création des vaccins. Le système immunitaire adaptatif repose principalement sur une balance entre plusieurs voies qui s'entraident : la voie cellulaire et humorale. Cet équilibre est souvent exprimé par le rapport Th1/Th2, qui permet de déterminer qui de la voie cellulaire Th1 ou humorale Th2 est favorisée. En fonction

du type de pathogène rencontré par l'organisme, grâce aux TLR et aux CPA, le système fait pencher le ratio en faveur d'une des deux voies afin d'obtenir une réponse immunitaire adaptée et efficace.

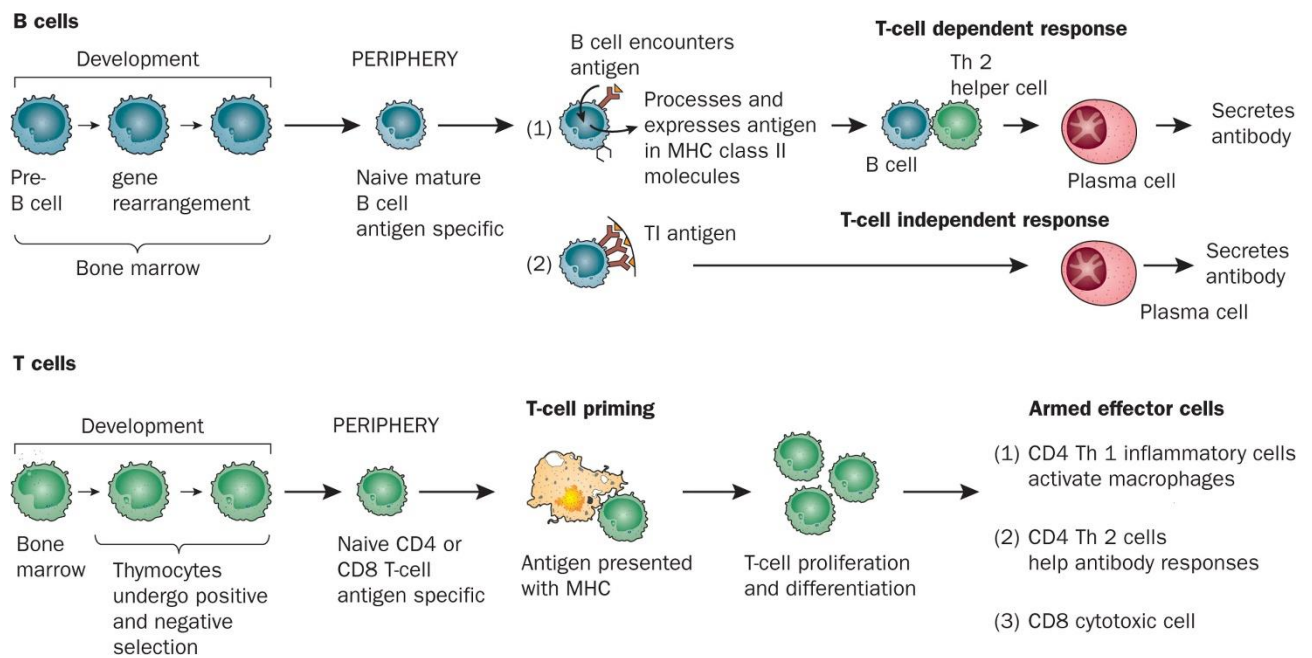


Figure 4 : Bilan sur les acteurs de l'immunité adaptative. Source : Parkin et Cohen, 2001

3. Les différents facteurs ayant une influence connue sur le SI

Le système immunitaire est complexe et agit dans tous les organes d'un individu. Cela le rend particulièrement sensible aux changements au sein de l'organisme mais aussi aux modifications du milieu extérieur. Différents facteurs ont été identifiés comme pouvant influencer le système immunitaire et son efficacité, comme par exemple l'âge, le rythme circadien (rythme d'alternance du jour et de la nuit) (Scheiermann *et al.*, 2013) ou encore l'état de bien-être de l'individu (Lasselin *et al.*, 2016). Le stress est aussi une source importante d'immunosuppression du fait de la production de cortisol depuis l'axe hypothalamo-hypophysaire, aussi bien chez l'humain que chez l'animal (Moeser *et al.*, 2017 ; Moetus, 2019 ; Padalino *et al.*, 2017). L'environnement dans lequel évolue l'organisme a également un impact sur le système immunitaire. Le stress thermique par exemple, qui devrait s'accroître à l'avenir avec les fortes températures liées au changement climatique, engendre des modifications de la productivité mais aussi une diminution de l'efficacité du système immunitaire en particulier sur les animaux de rente, favorisant alors l'apparition de affections et réduisant d'autant plus leur productivité (Bagath *et al.*, 2019 ; El-Tarabany, 2016). La pollution est aussi un paramètre dont l'impact sur le système immunitaire de l'humain est très étudié. Chez les animaux, cet impact est beaucoup moins référencé et la plupart des études portent sur des animaux de laboratoire. La thèse vétérinaire de Diane Ka en 2011 met en évidence que la pollution de l'air d'un domicile par l'encens ou la fumée de cigarettes, est un facteur prédisposant à l'apparition d'une affection cutanée, la dermatite atopique, dans l'espèce canine (Ka, 2011). Cette maladie, proche de l'eczéma humain, est la résultante d'une perturbation de la barrière cutanée et d'une dysrégulation du système immunitaire (Cochet Faivre, 2022). Ces résultats invitent à penser que la pollution peut engendrer des perturbations notables du système immunitaire sur nos animaux domestiques, de

rente et sauvages. La suite de ce texte visera à faire une étude bibliographique sur ce qu'il est connu de l'impact de la pollution sur le système immunitaire des animaux en se basant sur ce qui est connu sur l'humain.

II. La pollution, un impact sur le système immunitaire

1. Les animaux comme sentinelles de la pollution environnementale

Depuis longtemps, les animaux sont utilisés par les humains pour mieux comprendre le fonctionnement de l'organisme et mieux appréhender les problèmes de santé humaine. Ils ont aussi beaucoup été utilisés comme sentinelles pour marquer la présence de composés toxiques, comme par exemple l'utilisation de canaris dans les mines de charbon. Des expériences avaient alors montré que les canaris montraient des signes de détresse respiratoire puis une perte de connaissance en 30 min face à des élévations de monoxyde de carbone (CO) quand il fallait plus d'une heure à des souris. Cela permettait alors aux mineurs de fuir la mine avant d'avoir respiré trop de CO (Burrell et Seibert, 1914). Depuis cette époque, les animaux sont toujours utilisés pour mieux comprendre l'impact de l'environnement et de sa pollution sur notre santé. De très nombreuses études à ce sujet utilisent des animaux domestiques ou sauvages (voir tableau 1). Ces études prennent d'autant plus d'ampleur aujourd'hui face aux inquiétudes des consommateurs et face au constat du réchauffement climatique résultant des rejets humains de gaz polluants entre autres. Ainsi, les chercheurs utilisent des animaux sauvages pour étudier l'impact de la fumée des feux de forêts ou encore de polluants utilisés dans le passé mais ne se dégradant pas et restant stockés dans le sol et les eaux. Les animaux domestiques sont plus souvent employés pour étudier nos lieux de vie, et en particulier la différence entre milieu urbain et milieu rural.

Les animaux sauvages et notamment les animaux aquatiques sont les premiers exposés à la bioaccumulation, c'est-à-dire l'accumulation des polluants au sein des organismes. Quand il ne s'agit pas de métaux lourds, ces polluants sont regroupés sous le terme de polluants organiques persistants (POP). N'étant que peu ou pas dégradés par des microorganismes, les POPs s'accumulent dans les rivières et les océans (Chormare et Kumar, 2022). Les mammifères marins et les poissons sont donc d'excellents marqueurs de cette pollution environnementale par les activités humaines comme le montre l'étude de Beineke *et al.*, 2005 portant sur les marsouins communs.

Les études présentées dans le tableau 1 mettent en avant le lien entre santé et pollution. Certaines de ces études ont montré l'impact de la pollution sur le système immunitaire en lien avec des polluants spécifiques.

Tableau 1 : Synthèse de quelques études portant sur l'utilisation des animaux en guise de sentinelles pour étudier l'impact de la pollution sur la santé

Titre de l'étude	Polluant étudié	Animaux sentinelles	Source
Effects of wildfire smoke exposure on innate immunity, metabolism, and milk production in lactating dairy cows	Fumée de feu de forêts	Vaches laitières	Anderson <i>et al.</i> , 2022
Pet dogs as sentinels for environmental contamination	Pollution du milieu de vie urbain et campagne	Chiens de compagnie	Backer <i>et al.</i> , 2001
Experiments with Small Animals and Carbon Monoxide	Monoxyde de carbone dans les mines	Canaris	Burrell et Seibert, 1914
Sources of variation in innate immunity in great tit nestlings living along a metal pollution gradient: an individual-based approach	Pollution par les métaux lourds	Mésanges	Vermeulen <i>et al.</i> , 2015
Early Life Wildfire Smoke Exposure Is Associated with Immune Dysregulation and Lung Function Decrements in Adolescence	Fumée de feu de forêts	Jeunes Macaques	Black <i>et al.</i> , 2017
Effects of heavy metals on immunocompetence of white-footed mice (<i>peromyscus leucopus</i>)	Pollution par les métaux lourds	Souris sauvages	Biser <i>et al.</i> , 2004
Investigations of the Potential Influence of Environmental Contaminants on the Thymus and Spleen of Harbor Porpoises (<i>Phocoena</i>)	Polychlorobiphényles (PCB) et Diphényléthers polybromés (PBDE) (POPs présents dans les océans)	Marsouin commun	Beineke <i>et al.</i> , 2005
Passive Smoking and Canine Lung Cancer Risk	Fumée de cigarettes	Chiens de compagnie	Reif <i>et al.</i> , 1992
Retrospective Radiographic Analysis of Pulmonary Disease in Rural and Urban Dogs	Pollution du milieu de vie urbain et campagne	Chiens de compagnie	Reif et Cohen, 1970

2. Les principaux polluants connus ayant un impact sur le système immunitaire

Un composé est désigné comme un polluant lorsqu'il est introduit par l'humain dans l'environnement et qu'il présente une toxicité ou qu'il est présent dans des quantités supérieures à sa concentration naturelle (Landrigan *et al.*, 2018 ; Suzuki *et al.*, 2020). D'après Landrigan *et al.* qui se basent sur les résultats d'études de la World Health Organization (WHO), la pollution est une des causes majeures de décès dans le monde. La pollution de l'air est la première cause de décès avec une estimation autour de 6 millions de morts entre 2005 et 2015. La pollution de l'eau est la deuxième cause avec presque 2 millions de morts entre ces deux mêmes années. Enfin, la WHO cite la pollution des sols avec les métaux lourds et produits chimiques en troisième position.

A. Les métaux lourds

Comme beaucoup d'éléments chimiques, la concentration d'un métal dans notre organisme influe sur son fonctionnement (voir figure 5). Le schéma global est le même pour les métaux mais la largeur des différentes zones varie. Ainsi pour certains métaux, il faudra une forte concentration pour induire une toxicité quand pour d'autres, de faibles concentrations seront déjà délétères pour l'organisme.

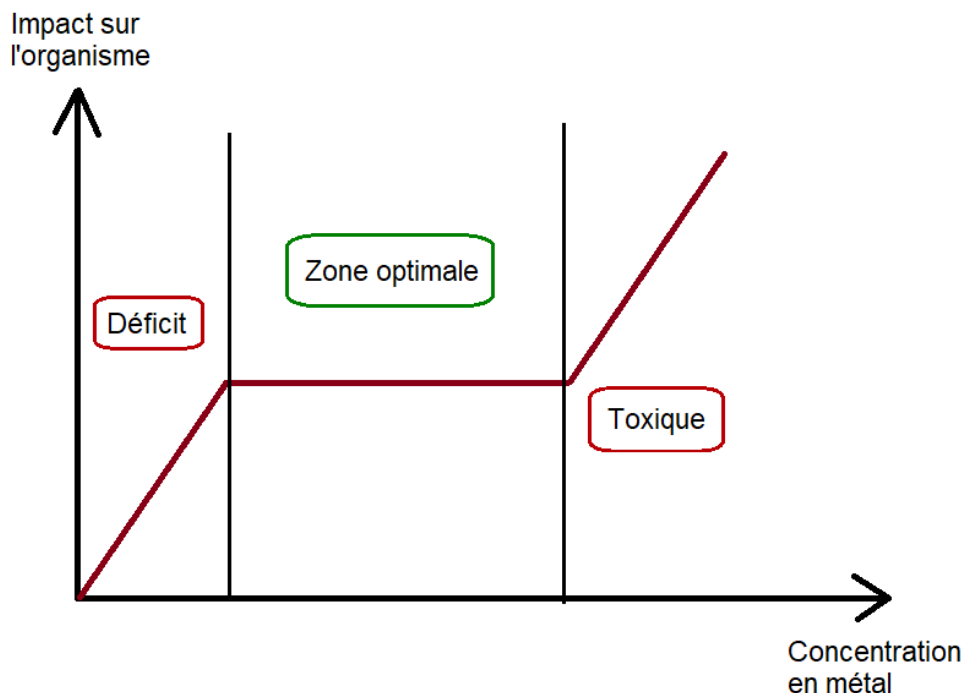


Figure 5 : Illustration des différentes zones d'impact sur l'organisme de la concentration d'un métal modifié d'après Das *et al.*, 2019

Certains métaux sont essentiels au fonctionnement de notre système immunitaire, notamment le zinc qui est impliqué dans la plupart des actions des cellules immunitaires ainsi que dans leurs interactions. Il permet notamment le bon fonctionnement de la phagocytose, de l'apoptose induite par les cellules NK et du chimiotactisme, c'est-à-dire l'attraction des autres cellules immunitaires sur le lieu de l'inflammation (Skrajnowska et Bobrowska-Korczak, 2019). Un déficit en zinc entraîne une augmentation de sécrétion des cytokines IL-1, IL-6 et TNF α (Wessels *et al.*, 2013) et un déséquilibre de la balance Th1/Th2 vers Th2 (Sprietsma, 1997). Celui-ci peut alors entraîner un développement de tumeurs en raison d'une baisse de la voie cellulaire de l'immunité

(Skrajnowska et Bobrowska-Korczak, 2019) ainsi que favoriser certaines maladies auto-immunitaires comme la polyarthrite rhumatoïde chez l'humain (Frangos et Maret, 2020). En parallèle, certains métaux classés dans les métaux lourds sont délétères pour le système immunitaire.

Les métaux lourds sont un groupe d'éléments larges comprenant des métaux mais aussi d'autres éléments dits métalloïdes (comme l'arsenic par exemple) qui présentent une potentielle toxicité à de plus ou moins forte concentration (Duffus, 2002) et souvent définis comme ayant une densité supérieure à 5 g/cm³. Les métaux inclus dans la liste des métaux lourds sont les suivants : Titane, Vanadium, Chrome, Manganèse, Fer, Cobalt, Nickel, Cuivre, Zinc, Arsenic, Molybdène, Argent, Cadmium, Etain, Platine, Or, Mercure et Plomb (Briffa *et al.*, 2020).

Ces métaux lourds proviennent de phénomènes naturels (volcaniques notamment) et composent la croûte terrestre (He *et al.*, 2005) mais leur concentration est accentuée par les activités humaines. En effet, ces métaux lourds sont présents dans différents secteurs économiques comme en particulier l'agriculture (de par l'utilisation de certains pesticides, herbicides, fongicides ou d'engrais en contenant) ou l'industrie notamment métallurgique et minière (He *et al.*, 2005). Ces différents métaux présentent des toxicités différentes selon les organes atteints comme le montre la figure 6. Il est important de noter que plusieurs des métaux lourds de la figure 6 portent atteinte au système immunitaire, notamment l'arsenic, le cadmium, le plomb, le cuivre et le mercure (Chormare et Kumar, 2022).

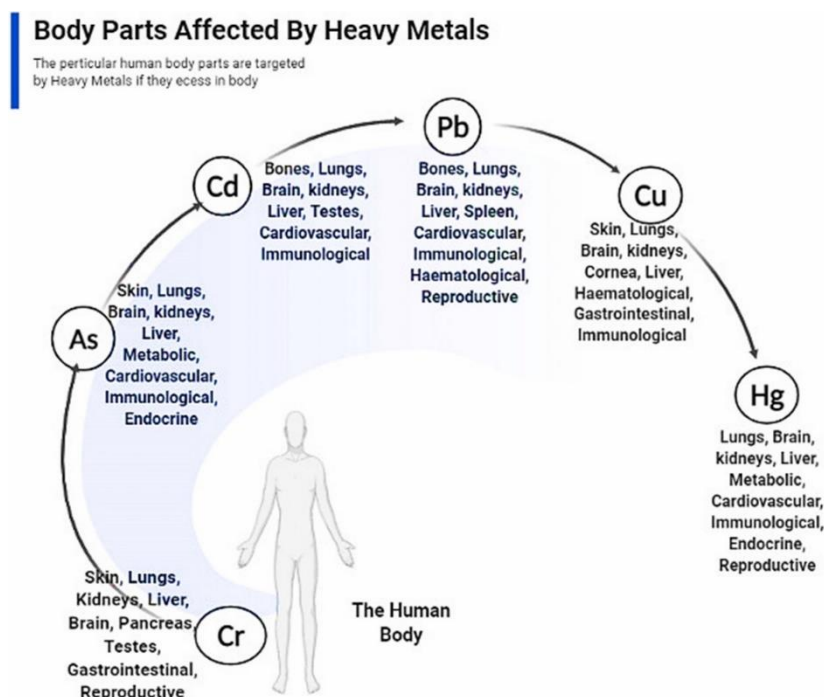


Figure 6 : Les différents organes touchés par les métaux lourds Chrome (Cr), Arsenic (As), Cadmium (Cd), Plomb (Pb), Cuivre (Cu) et Mercure (Hg). Source : Chormare et Kumar (2022)

a. Le cadmium

Le cadmium est un métal proche chimiquement du zinc et souvent retrouvé lors des processus industriels de transformation de zinc ou de plomb comme particule d'impureté. Il est intentionnellement incorporé dans des produits comme les téléviseurs, laser, batteries, certaines peintures et cosmétiques, et est présent dans les cigarettes. Il est naturellement présent dans la croûte terrestre. L'absorption se fait principalement par voie respiratoire et digestive. Ainsi, les personnes les plus exposées sont les ouvriers travaillant dans les industries ainsi que les fumeurs. Pour la population humaine, la principale exposition provient du régime alimentaire. Les organes touchés prioritairement par le cadmium sont les poumons, le foie et les reins (Bernhoft, 2013 ; Briffa *et al.*, 2020 ; Mirkov *et al.*, 2021). Le cadmium est classé par l'Agence internationale de recherche sur le cancer (IARC) dans le groupe I des substances carcinogènes pour l'humain (Centre International de Recherche sur le Cancer, 1993). Une étude de Amzal *et al.*, 2009 sur 680 femmes suédoises estime la prise journalière moyenne de cadmium autour de 14 µg dans des zones non industrialisées, valeur proche des études en Europe et aux Etats-Unis. Cette valeur correspond à une dose de 0,4 µg/kg/jour en moyenne, ce qui reste en dessous des recommandations maximales fixées autour de 0,8 µg/kg/j.

De nombreuses études ont cherché à comprendre l'impact d'une exposition au cadmium sur le système immunitaire chez les humains en expérimentant principalement sur des animaux (souris et rats) ou *in vitro*. Le mécanisme principal de toxicité du cadmium est par le biais du stress oxydatif. Il altère aussi les métabolismes du zinc, cuivre, fer et sélénium qui sont indispensables dans les réactions enzymatiques au sein de l'organisme (Briffa *et al.*, 2020).

Lors de l'absorption du cadmium, celui-ci se concentre dans les reins et le foie ainsi que dans les poumons (même si l'absorption est strictement orale (Kulas *et al.*, 2019)). Le métal induit un stress oxydatif sur les cellules locales et stimuler les cellules de l'immunité innée en déclenchant une inflammation locale. L'étude de Kulas *et al.*, 2019 a montré qu'à de faibles doses (5 ppm), le cadmium entraîne une augmentation des cytokines IL-6, IL-1β et TNFα alors qu'à de fortes doses (50 ppm), une baisse d'IL-1β et TNFα sans effet sur l'IL-6, est rapportée. Ceci est aussi observé dans d'autres publications (Mirkov *et al.*, 2021). De plus, le cadmium entraîne une augmentation de l'hématopoïèse en particulier des cellules d'origine myéloïdes avec une déplétion des cellules d'origine lymphoïdes (Zhang *et al.*, 2016). Cela induit, entre autres, une augmentation de la concentration sanguine en neutrophiles. L'expression augmentée du récepteur CD11b suite à l'exposition au cadmium à la surface des neutrophiles entraîne une plus grande extravasation par les vaisseaux sanguins périphériques induisant alors des lésions inflammatoires locales notamment au niveau des poumons (Djokic *et al.*, 2014). Cette étude de Djokic *et al.* (2014) montre une baisse de l'expression de l'acide ribonucléique messager (ARNm) des cytokines IL-1β, IL-6 et TNFα par les polynucléaires du sang de rats pour une dose de 1 mg/kg de cadmium, cela peut expliquer qu'à de fortes doses les quantités plasmatiques de ces cytokines diminuent. Sur les macrophages, un impact similaire sur les cytokines est observé. Lors d'une faible exposition au cadmium *in vitro* de macrophages de souris, les cytokines IL-1β, IL-6 et TNFα voit leur quantité augmenter alors qu'après une exposition sur une plus longue durée (24h) l'expression de l'ARNm de ces cytokines diminuent (Jin *et al.*, 2016). Ainsi à courte durée d'exposition, le cadmium induit une augmentation conjointe des activités pro-inflammatoires des neutrophiles et macrophages. Cela entraîne des défauts dans les fonctionnements des macrophages ou apparentés locaux (cellules de Kupffer...) comme par exemple des perturbations dans les activités des ostéoblastes et ostéoclastes entraînant chez l'humain une ostéoporose et ostéomalacie cadmium-induite (Chen *et al.*, 2013). Ces dérèglements

dans la sécrétion des cytokines, entraînent un défaut dans les voies de signalisations vers l'immunité adaptative par les macrophages qui sont des CPA.

Sur l'immunité adaptative, le cadmium a différents effets. Une apoptose des PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells comprenant les lymphocytes et monocytes du sang) chez l'humain a été mise en évidence *in vitro* par modification membranaire mitochondriale (Alkharashi *et al.*, 2017). Le cadmium impacte également le développement des lymphocytes T. Une étude *in vitro* de Pathak et Khandelwal, 2008 sur des cellules de souris a montré que l'exposition à différentes durées et doses de cadmium entraîne une déplétion des LTCD4 par apoptose supérieure à celle des LTCD8 et donc une modification du ratio CD4/CD8 en faveur des cellules cytotoxiques. De plus, le cadmium entraîne une diminution des cellules CD4⁺CD8⁺ doubles positives (cellules précurseurs des LTCD4 et LTCD8 dans le thymus) ainsi qu'une augmentation des CD4⁺CD8⁻ doubles négatives (LT immatures du thymus). Les changements observés sont visibles à partir de 12h d'exposition pour 25 µM de cadmium. Ces résultats aboutissent donc à des défauts dans l'expression et la sélection des lymphocytes T pouvant aboutir à une immunosuppression. Chez l'humain, le cadmium déplace la balance Th1/Th2 des LTCD4 comme le montre l'étude *in vitro* de Marth *et al.* (2001) sur des PBMCs humains. À de faibles doses, c'est la voie Th2 qui est favorisée par la sécrétion de cytokines IL4, IL5, IL6, IL8 et TNF-α, cela a pour conséquence une sensibilité accrue aux réactions allergiques car la voie humorale est stimulée de manière aspécifique sans cible précise. Cependant, à de fortes doses c'est plutôt la voie Th1 qui est favorisée entraînant probablement une déplétion de la réponse humorale.

Ainsi, comme le résume la figure 7 ci-dessous, à de faibles doses ou de faible durée d'exposition le cadmium induit plutôt une immunostimulation liée au stress oxydatif local provoquant des sensibilités particulières pour les allergies. À l'inverse à forte dose et/ou long terme, celui-ci induit une apoptose des cellules immunitaires et des modifications dans les voies de signalisations des cellules immunitaires, modifiant leur différenciation et provoquant une immunosuppression.

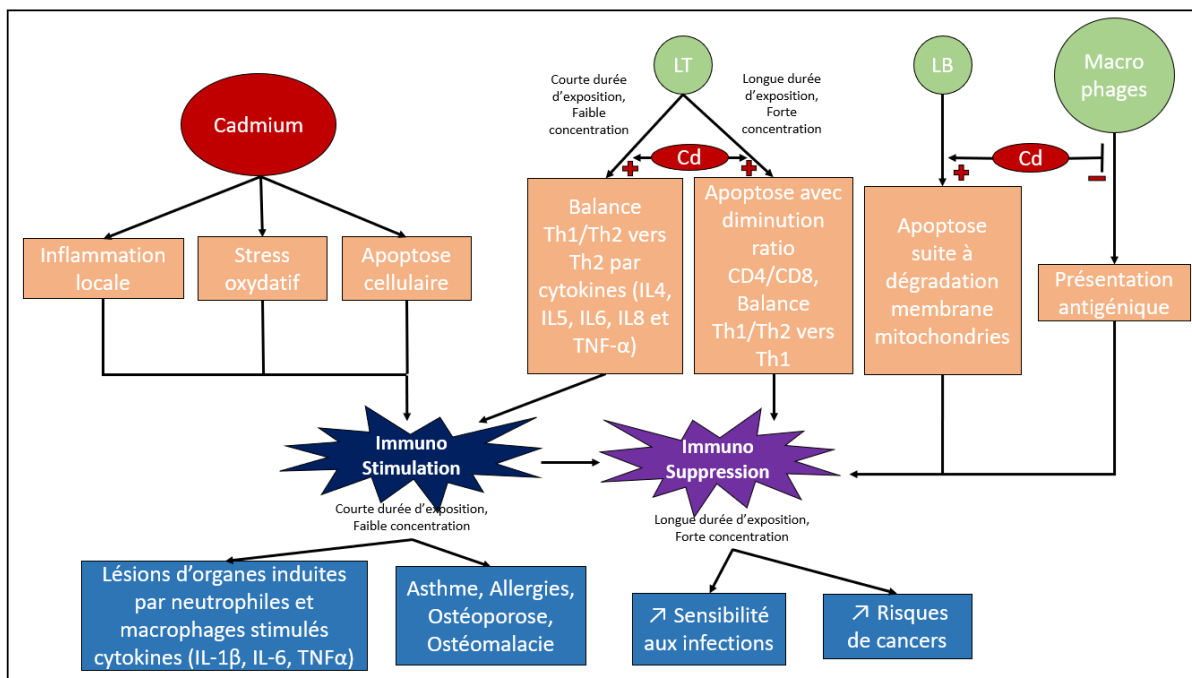


Figure 7 : Bilan des effets du cadmium connus sur le système immunitaire d'après les données de Marth *et al.*, 2001 ; Pathak et Khandelwal, 2008 ; Chen *et al.*, 2013 ; Djokic *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2016 ; Jin *et al.*, 2016 ; Alkharashi *et al.*, 2017 ; Kulas *et al.*, 2019 ; Mirkov *et al.*, 2021

b. L'arsenic

L'arsenic est un métalloïde utilisé en industrie (bronze, verre, fabrication de circuits électriques) ainsi que dans certains pesticides (World Health Organization, 1981). Il est classé par la WHO comme un des 10 produits chimiques d'intérêt majeur en santé publique (World Health Organization, 2022). Son absorption se fait majoritairement par la voie respiratoire, mais est également possible par la voie orale, ou encore, minoritairement, de façon passive à travers la peau (Briffa *et al.*, 2020). Il en existe deux formes : une forme inorganique, toxique, et une autre, organique, beaucoup plus inoffensive (Vermeulen *et al.*, 2015). Ce métal lourd est principalement présent dans l'eau et notamment l'eau de boisson, sous sa forme inorganique, ainsi que dans la nourriture (poissons principalement) sous sa forme organique. De nombreuses populations humaines, pour un total estimé à environ 100 millions d'individus, sont exposées. Les régions les plus touchées se situent notamment en Inde, Bangladesh, Vietnam, Chili, Argentine... Dans ces pays, les concentrations dans les eaux de boissons sont nettement supérieures aux recommandations de la WHO de 10 µg/L avec parfois plus de 100 µg/L (World Health Organization, 2022). Les origines de ces contaminations sont soit anthropogéniques soit naturelles (sédiments et déchets volcaniques) (Nordstrom, 2002). Un grand nombre d'animaux sont donc probablement exposés à ce métal malgré le peu d'études sur ce sujet.

En raison de cette exposition massive de l'humain à l'arsenic, de nombreuses études ont visé à quantifier son impact sur la santé humaine. Il est prouvé que l'arsenic engendre des lésions cutanées (perte ou augmentation de la pigmentation, hyperkératose) ainsi que des troubles cardiovasculaires (athérosclérose, hypertension artérielle) (States *et al.*, 2009 ; Tseng, 2002). Il augmente aussi les risques de développer des cancers de la vessie, des reins, des poumons et de la peau (Ferreccio *et al.*, 2000 ; Karagas *et al.*, 2004, 2001). Les actions de l'arsenic sur l'organisme sont nombreuses, avec en particulier des conséquences sur le système immunitaire. Plusieurs études sur des cohortes humaines d'adultes et enfants ont montré une baisse significative des cytokines plasmatiques IL-2, IFN-γ et TNFα de la voie Th1 en présence d'arsenic (Ahmed *et al.*, 2014 ; Biswas *et al.*, 2008 ; Soto-Peña *et al.*, 2006). Cependant, l'action de l'arsenic sur la voie Th2 n'est pas clairement établie, certaines études se contredisant et montrant une altération des cytokines IL-4, IL-5 et IL-10 de la voie Th2 (Biswas *et al.*, 2008) mais aussi une absence d'altération d'IL-4 et IL-10 (Soto-Peña *et al.*, 2006). Cette différence entre les deux études provient probablement des concentrations d'arsenic auxquelles ont été exposés les cohortes : 746,79 µg/L dans les urines pour l'étude de Biswas *et al* contre 186,7 µg/L dans les urines pour Soto-Peña *et al*. Cette altération des cytokines de la voie Th1 sans altération des cytokines de la voie Th2 a aussi été mise en avant dans une étude *in vitro* sur des lymphocytes T humains (Morzadec *et al.* (2012) (voir figure 8). L'arsenic entraîne dans tous les cas une altération de la balance Th1/Th2 du système immunitaire qui serait plutôt en défaveur de la voie Th1. De plus, l'étude de Soto-Peña *et al.* met en avant au sein des PBMCs étudiés une baisse des lymphocytes T helper sans modification significative des populations de lymphocytes T cytotoxiques, de lymphocytes B ou des cellules NK ainsi qu'une diminution du ratio lymphocytes T helper CD4 sur lymphocytes T cytotoxiques CD8 en présence d'arsenic.

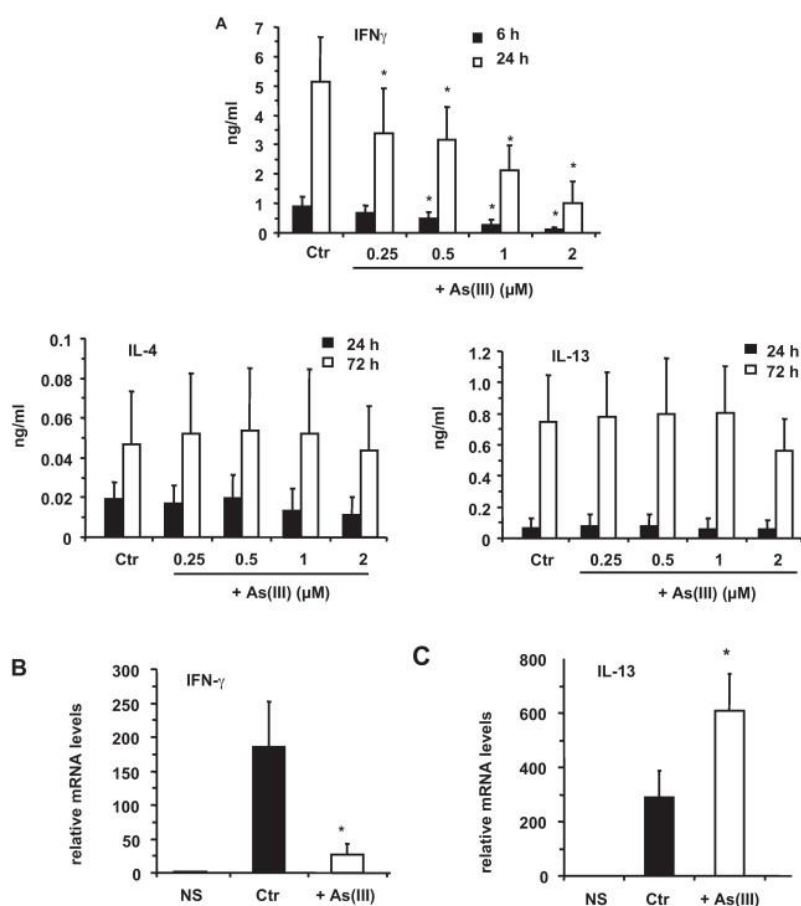


Figure 8 : Décroissance des concentrations en IFN γ de la voie Th1 sans altération des cytokines IL-4 et IL-13 de la voie Th2 selon un gradient et un temps d'exposition des cellules *in vitro* à l'arsenic. Source : Morzadec *et al.*, 2012

Chez l'animal, l'effet de l'arsenic a été moins amplement étudié *in vivo*. Les études se concentrent souvent sur l'exploration de l'effet de l'arsenic sur des organes précis. On peut citer l'effet immunosuppresseur que le métal exerce sur le thymus des souris (Xu *et al.*, 2016) et des poules (Liu *et al.*, 2018), l'altération du système immunitaire inné du tractus digestif des souris (Medina *et al.*, 2020) ainsi que l'atteinte de la bourse de Fabricius, organe lymphoïde primaire essentiel au développement et la maturation des lymphocytes chez les poules (Liu *et al.*, 2020). Dans cette dernière étude de Liu *et al.*, l'expression des cytokines de la voie Th1 comme de la voie Th2 par les cellules immunitaires locales à la bourse de Fabricius est significativement augmentée à l'exception d'IL-10 en présence d'arsenic à 30 mg/kg. Ces études montrent toutes que l'arsenic par son effet de stress oxydatif induit une apoptose cellulaire des organes dans lesquels le métal s'accumule. Ce stress oxydatif induit une inflammation locale au niveau des organes où s'accumule le métal, notamment le foie et les reins, comme le montre l'étude de Duan *et al.*, 2022 sur des souris. Les cytokines IL-1 β , IL-6, IL-12 et TNF α étaient augmentées après une exposition à l'arsenic de ces souris, en particulier sur 3 mois. A l'échelle de l'organisme, une étude de Vermeulen *et al* datant de 2015 sur des mésanges exposées à un gradient de métaux lourds comprenant l'arsenic mais aussi le cadmium et le plomb n'a pas réussi à montrer d'impact à l'échelle de la population de ces métaux sur l'immunité selon le gradient mis en place et suggère que les effets de ces métaux lourds doivent être étudiés à l'échelle individuelle pour être mieux compris.

Les effets de l'arsenic sur les autres cellules du système immunitaire comprennent globalement une immunosuppression avec notamment une diminution de la production des anticorps par les lymphocytes B, une diminution de la phagocytose et de la fonction de présentation antigénique des macrophages, ainsi qu'une altération des fonctions des neutrophiles et des cellules NK (Dangleben *et al.*, 2013). Ainsi, l'arsenic par ses effets sur l'organisme, engendre une inflammation locale et des lésions cellulaires accompagnés d'une immunosuppression à l'échelle de l'organisme augmentant ainsi le risque de cancer comme le résume le schéma bilan en figure 9. Jusqu'à aujourd'hui, ces effets sont principalement étudiés dans un contexte de santé publique humaine et non chez l'animal.

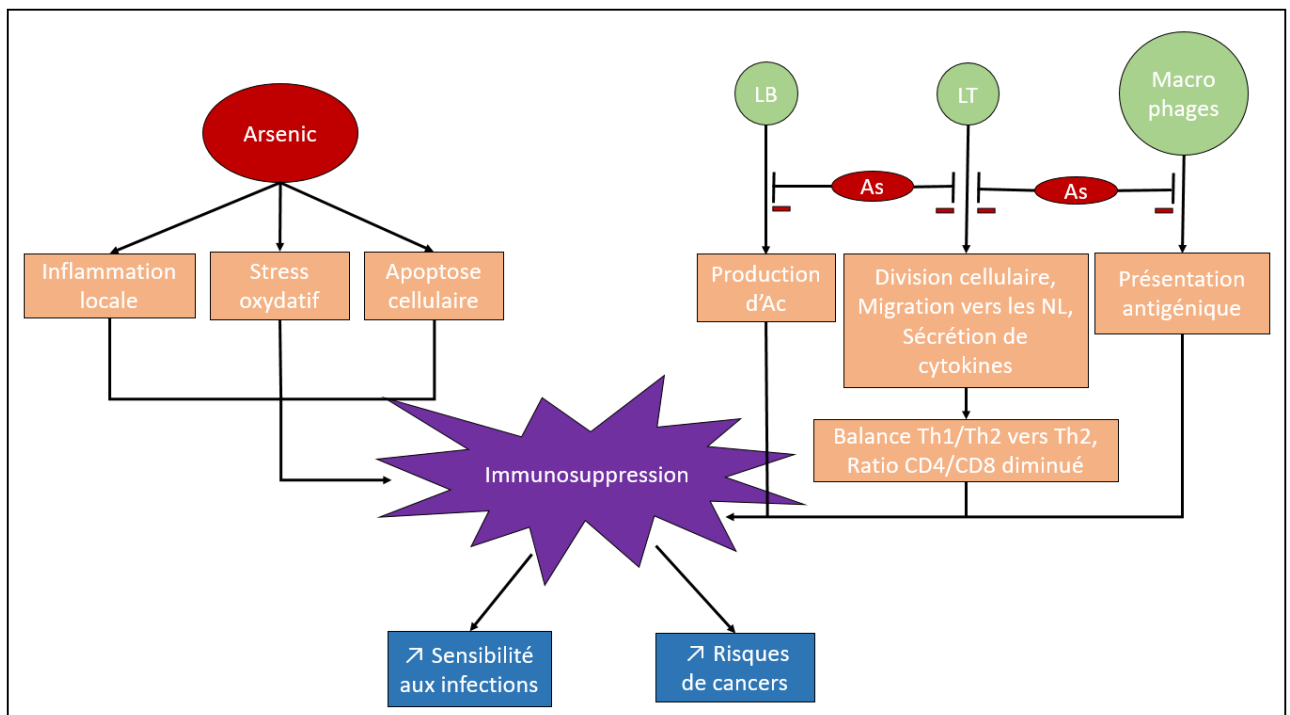


Figure 9 : Bilan des effets connus sur le système immunitaire d'une exposition à l'arsenic. Inspiré de Dangleben *et al.*, 2013

c. Le plomb

Le plomb est un métal lourd présent dans la croûte terrestre et qui remonte à la surface de façon naturelle par les volcans notamment. Il entraîne une pollution de l'air et de l'eau contaminant ainsi la chaîne alimentaire. Cependant, les quantités de plomb rejeté dans l'air naturellement sont bien inférieures à celles rejetées par l'humain. D'après la World Health Organization en 1995, 19 000 tonnes par an de plomb est rejeté naturellement contre 126 000 tonnes lié aux mines, aux fonderies et son utilisation dans des produits de manufacture (batteries, verre...). Cependant, depuis l'apparition de pétrole sans plomb, les rejets de plomb ainsi que la quantité de plomb à laquelle les populations étaient exposés (étude effectuée aux Etats-Unis) a nettement diminué (figure 10, Järup, 2003). Les concentrations de plomb auxquels les animaux peuvent être exposés sont donc plutôt localisées proches des mines et industries utilisant du plomb, dans l'air notamment ainsi que dans l'alimentation. Chez l'humain, l'exposition au plomb est équivalente par l'air et par la nourriture. Environ 50% du plomb inhalé est absorbé par les poumons. Les enfants sont particulièrement sensibles à ce métal. En effet, ils l'absorbent plus facilement que les adultes par le tractus digestif (50% contre 15%) et le métal assimilé peut passer la barrière hémato-encéphalique, encore

perméable, et engendrer des lésions neurologiques. Une fois dans l'organisme, le plomb se lie aux érythrocytes dans le sang et par compétition avec le calcium se stocke dans les os ce qui lui confère une demi-vie particulièrement longue : 1 mois dans le sang avec élimination urinaire et en moyenne 25 ans dans le squelette (World Health Organization, 1995). Chez les animaux, des sensibilités d'espèces existent avec une sensibilité importante des chevaux, bovins et carnivores alors que les des caprins, porcins et volailles sont résistants. Il existe deux formes d'atteintes distinctes, le saturnisme aigu lié à une exposition unique par ingestion accidentelle de grande quantité de plomb (devenue rare aujourd'hui) et le saturnisme chronique lié à une exposition par administration répétée et possible en raison de l'effet toxique cumulatif du métal. Le saturnisme aigu entraîne notamment des troubles neurologiques (convulsions, amaurose), des troubles digestifs (vomissements, alternance diarrhée et constipation) ainsi qu'une hypersalivation et une anémie par inhibition de la synthèse de l'hème. Le saturnisme chronique entraîne des signes cliniques plus discrets qui, sur les animaux de production, se traduit souvent par des troubles de la reproduction en élevage (Tissier, 2020).

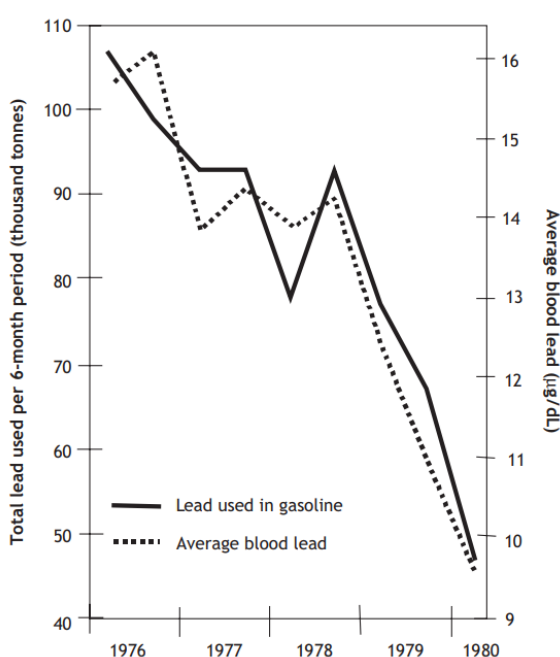


Figure 10 : Courbe montrant le lien entre l'utilisation de plomb dans le pétrole (courbe pleine) et le niveau de plomb sanguin (courbe en pointillé) chez l'humain en fonction des années d'après Järup, 2003

Malgré la baisse de l'exposition au plomb de la population, celui-ci reste un métal lourd de préoccupation importante de par ses effets néfastes sur les enfants sur leur développement et notamment celui du système nerveux (Järup, 2003). Le plomb possède par ailleurs des effets non négligeables et très nombreux sur le système immunitaire qui ont été mis en évidence par des études sur les animaux (oiseaux et souris principalement) *in vitro et in vivo* mais aussi sur l'humain, exposés au plomb. Quand les deux métaux lourds cités précédemment avaient un impact local avec des réactions d'oxydation, d'apoptose des cellules et d'inflammation locale, le plomb possède une action plus directe sur les cellules constituant le système immunitaire. Sur le système immunitaire inné, le plomb engendre une augmentation du ratio neutrophiles sur lymphocytes sans modification du ratio lymphocytes sur monocytes chez les humains exposés au plomb (Meng *et al.*, 2021) et une augmentation du nombre de neutrophiles dans le sang d'adultes (Bunn *et al.*, 2001). Cependant,

cette modification n'est pas retrouvée dans cette autre étude de 2018, ou au contraire c'est le ratio lymphocytes sur monocytes qui est modifié et non le ratio neutrophile sur lymphocyte (Chwalba *et al.*, 2018). Cela est expliqué d'après Meng *et al* par la différence de durée et de concentration d'exposition plus élevé dans la seconde étude qui mettrait en avant une cinétique d'exposition avec en premier lieu une augmentation du nombre de neutrophiles puis une déplétion monocyttaire. Le plomb entraîne cependant une baisse du chimiotactisme des neutrophiles (Başaran et Ündeğer, 2000). Il a été montré que le plomb entraîne une réponse diminuée des cellules de la moelle osseuse au facteur de stimulation hématopoïétique CSF-1. Le CSF-1 est un ligand permettant à ces cellules de s'orienter vers la voie myéloïde puis par la suite stimule la différenciation des monocytes en macrophages dans les tissus (Kowolenko *et al.*, 1991). Cela entraîne donc une déplétion dans la population monocyttaire et macrophagienne. Pour les macrophages localisés dans les tissus, des modifications de leur métabolisme et des facteurs exprimés sur leur membrane ont lieu en présence de plomb. Ces modifications comprennent notamment :

- Une augmentation de l'acide arachidonique (AA) membranaire (Knowles et Donaldson, 1997). Cet acide gras permet la sécrétion de prostaglandines (PGE2 et PGI2) possédant notamment une action pro-inflammatoire ainsi que la sécrétion de molécules comme la lipoxine A4 avec une action anti-inflammatoire (Tallima et El Ridi, 2017).
- Une baisse de production de monoxyde d'azote (NO) et d'IL-12 entraînant une baisse du chimiotactisme (Lee *et al.*, 2001).
- Une augmentation de la production de TNF α (Chen *et al.*, 1999 ; Miller *et al.*, 1998) et IL-6.
- Une augmentation de la production de ROIs : dérivés réactifs de l'oxygène permettant l'élimination des pathogènes et cellules cancéreuses mais dont l'emballement créer des lésions par oxydation (Dietert et Piepenbrink, 2006 ; Pineda-Zavaleta *et al.*, 2004).
- Une augmentation de la sécrétion de PGE2 (Knowles et Donaldson, 1997) entraînant une inflammation et des lésions tissulaires localisées.
- Une phagocytose par les macrophages de poules exposés au plomb moins efficace (Knowles et Donaldson, 1997).
- Une baisse de la présentation antigénique des macrophages par interaction avec les antigènes et les récepteurs CMH II (Heo *et al.*, 1996 ; Vallverdú-Coll *et al.*, 2019).

Le plomb possède aussi des actions connues sur le système immunitaire adaptatif. Plusieurs publications montrent que le plomb a un impact direct sur la balance Th1/Th2 des LTCD4. En effet, le plomb entraîne une augmentation des récepteurs CMH II sur la membrane des CPA (notamment des cellules dendritiques et des LB) ce qui favorise la prolifération des cellules de la voie Th2 (Gao *et al.*, 2007). De plus, il favorise la différenciation des LT Th0 en Th2 mais inhibe celle en Th1 (Heo *et al.*, 1996; McCabe et Lawrence, 1991). Cela entraîne alors une dépression de l'immunité cellulaire et donc une immunosuppression. Cette diminution de l'immunité cellulaire est, de plus, démontrée par une diminution marquée en présence de plomb de l'hypersensibilité de type IV dite retardée et médiée par les lymphocytes T Th1, les monocytes/macrophages et les LTCD8 (Chen *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2001 ; Lee et Dietert, 2003 ; Miller *et al.*, 1998). L'effet du plomb sur les LTCD8 reste lui plus controversé avec une étude montrant une augmentation de leur nombre (Goyal *et al.*, 2021) et d'autres ne montrant pas d'impact significatif du plomb sur ces cellules (Chen *et al.*, 1999 ; Miller *et al.*, 1998 ; Ündeğer *et al.*, 1996). En revanche, le plomb pourrait agir sur d'autres LTCD4 notamment en diminuant le nombre de LTreg (cellules permettant le rétrocontrôle négatif de la réaction

inflammatoire) et en augmentant le nombre des Th17 (Goyal *et al.*, 2021). Les LT Th17 sont des cellules qui favorisent l'inflammation en recrutant des neutrophiles et en produisant des cytokines spécifiques (IL-17, IL-22 et IL-23). Ils jouent un rôle essentiel dans de nombreuses maladies auto-immunitaires (Lee, 2018). Cette modification de la balance Th17/Treg entraîne donc un risque accru d'auto-immunité par une mauvaise régulation du système immunitaire et un emballement anormal des cellules. Risque d'auto-immunité pouvant être accentué par les modifications que le plomb engendre sur certaines protéines de l'organisme et notamment les protéines neuronales engendrant alors une production anormale d'auto-anticorps (El-Fawal *et al.*, 1999 ; Waterman *et al.*, 1994).

L'action du plomb sur les lymphocytes B et l'immunité humorale n'est pas unanime. Beaucoup de publications montrent une déplétion de la production d'anticorps par les LB : diminution des IgM et IgG, sans corrélation statistique avec l'exposition au plomb, chez des jeunes filles (Sun *et al.*, 2003), diminution des IgM et IgG chez des adultes exposés au plomb (Başaran et Ündeğer, 2000 ; Ündeğer *et al.*, 1996). À l'inverse, certaines publications montrent un impact nul (Chen *et al.*, 1999), voire une augmentation de production des IgA, IgG et IgM chez des enfants de moins de 3 ans (Sarasua *et al.*, 2000). D'après Dietert et Piepenbrink dans une revue de 2006, ces différences seraient liées à la concentration et la durée d'exposition. Il est certain que l'impact du plomb sur la voie Th2 modifie l'immunité humorale de l'individu en influençant notamment la commutation de classe ou « switch » isotypique des immunoglobulines, mécanisme par lequel les immunoglobulines deviennent plus spécifique de l'antigène. Il est reconnu que le plomb augmente notablement le nombre d'IgE dans le sang (Sun *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2017). Cette augmentation est corrélée à une augmentation de production de la cytokine IL-4 (Chen *et al.*, 1999 ; Heo *et al.*, 1996 ; Miller *et al.*, 1998). Inversement, le plomb inhibe la production d'IFN γ par les LT Th1 (Chen *et al.*, 1999 ; Heo *et al.*, 1996 ; Miller *et al.*, 1998 ; Snyder *et al.*, 2000). Ce niveau d'IgE reste haut même longtemps après l'exposition au plomb (transplacentaire, par le lait ou par une exposition au plomb chez l'adulte) et favorise notamment chez les jeunes le développement d'hypersensibilité avec de l'asthme ou de l'atopie (Snyder *et al.*, 2000). La figure 11 effectue un bilan des différents effets du plomb sur le système immunitaire cités précédemment.

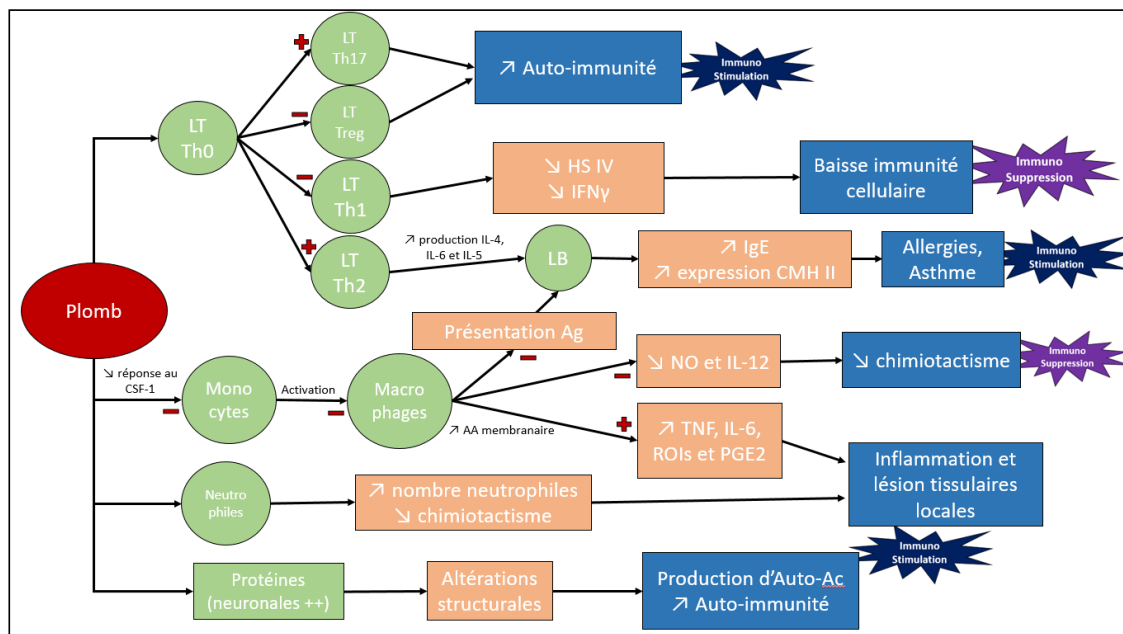


Figure 11 : Bilan des effets du plomb sur le système immunitaire. Modifié d'après Dietert et Piepenbrink, 2006 ; Vallverdú-Coll *et al.*, 2019

d. Le mercure

Le mercure est un métal lourd présent naturellement dans la croûte terrestre et donc relâché lors d'activités volcaniques ou sismiques. Il existe sous trois formes : le mercure élémentaire, le mercure inorganique et le mercure organique (notamment le méthyl mercure). Bien que la contamination de l'environnement par les sources naturelles de mercure existe, c'est l'extension des activités humaines exploitant cette ressource qui engendre la plus grosse contamination en mercure de l'environnement (Vas et Monestier, 2008). Ainsi, le métal s'accumule particulièrement bien dans la chaîne alimentaire, et en particulier aquatique, avec une bioaccumulation non-négligeable dans les poissons dits prédateurs. Les activités humaines relâchant du mercure sont principalement les mines d'or, la combustion de charbon et de détritiques ainsi que l'utilisation dans certains pesticides, vaccins et produits de soins dentaires. L'absorption du métal se fait principalement par voie inhalée pour la forme élémentaire, par voie orale en faible quantité (entre 10 et 40%) pour la forme inorganique et par voie inhalée, orale et transcutanée pour la forme organique. Une fois absorbée, la molécule traverse aisément la barrière hémato-encéphalique ou le placenta. Les intoxications avec de fortes doses de mercure causent des symptômes neurologiques (retard mental, cécité...) et une néphrotoxicité pouvant mener à la mort. Ces intoxications restent rares chez l'humain. L'exposition subchronique provoque, quant à elle, une atteinte du système immunitaire avec notamment une mise en place d'auto-immunité (Centre International de Recherche sur le Cancer, 1993 ; Vas et Monestier, 2008 ; World Health Organization, 2021). L'IARC ne classe pas le mercure comme carcinogène à l'exception de sa forme inorganique classée dans le groupe 2B (possiblement carcinogène).

Les conséquences de l'accumulation de mercure dans l'organisme varient selon la dose et la forme de la molécule. Une immunosuppression a été mise en évidence pour la forme organique alors qu'une immunostimulation semble plus importante avec le mercure sous sa forme inorganique (Havarinasab et Hultman, 2005). Même à faible exposition, le mercure induit une diminution de la prolifération des lymphocytes T plus notable avec le mercure organique, mais celle-ci n'est visible *in vitro* uniquement en présence de monocytes. L'effet immunosuppresseur sur les lymphocytes T du mercure est donc lié à une perturbation de la viabilité des monocytes (Shenker *et al.*, 1992). Les lymphocytes B quant à eux, voient leur prolifération et production d'immunoglobulines diminuer en présence de mercure, sans différence en présence ou non de monocytes. L'effet toxique du mercure a donc lieu directement sur les LB mais celui-ci est visible sur les stades précoces d'activation des LB. Les LB matures sont plus résistants à l'effet immunosuppresseur du mercure (Shenker *et al.*, 1993).

L'effet immunostimulateur du mercure a surtout été mis en évidence avec le mercure inorganique (Havarinasab et Hultman, 2005). Cet effet semble moins présent avec les formes organiques de mercure comme le méthyl mercure ou le thiomersal (composé utilisé auparavant comme conservateur de vaccins (Centers for Disease Control and Prevention, 2020)). Le tableau 2 montre les différences d'effets sur différents aspects du système immunitaire selon les formes de mercure testées.

Tableau 2 : Effets des différentes formes de mercure sur le système immunitaire d'après Havarinasab et Hultman (2005)

Effets sur le SI	Mercure inorganique HgCl ₂ ^a	Méthyl mercure ^b	Thiomersal ^c
Immunosuppression	0	+	++
Anticorps sérique anti-nucléaire/anti-fibrillarine	+++	+	++
Activation polyclonale LB	+++	+	++
LB splénique	++	+	+
LT splénique	+++	+	++
Concentration sérique totale d'IgG	+++	+	+
Concentration sérique totale d'IgE	+++	+	++
Dépôts d'immuns-complexes (IC) glomérulaires ou dans la paroi des vaisseaux	++	0	+

0 : pas de changement, + : augmentation discrète, ++ : augmentation modérée, +++ : augmentation forte

^a d'après (Johansson *et al.*, 1998)

^b d'après (Häggqvist *et al.*, 2005)

^c d'après (Havarinasab *et al.*, 2005)

SI = Système immunitaire

L'effet auto-immun du mercure a été très étudié sur des modèles de souris en laboratoire. Le mercure entraîne une production d'anticorps anti-nucléaires (AAN) et d'anticorps anti-fibrillarine (AFA) en lien avec des prédispositions génétiques chez les souris (Hultman *et al.*, 1992 ; Johansson *et al.*, 1998). Le mécanisme de mise en place de cette auto-immunité est complexe. Il est détaillé dans la figure 12. Le génotype, la dose de mercure ainsi que la durée d'exposition de l'individu influence l'apparition et la sévérité de la maladie (Pollard *et al.*, 2019).

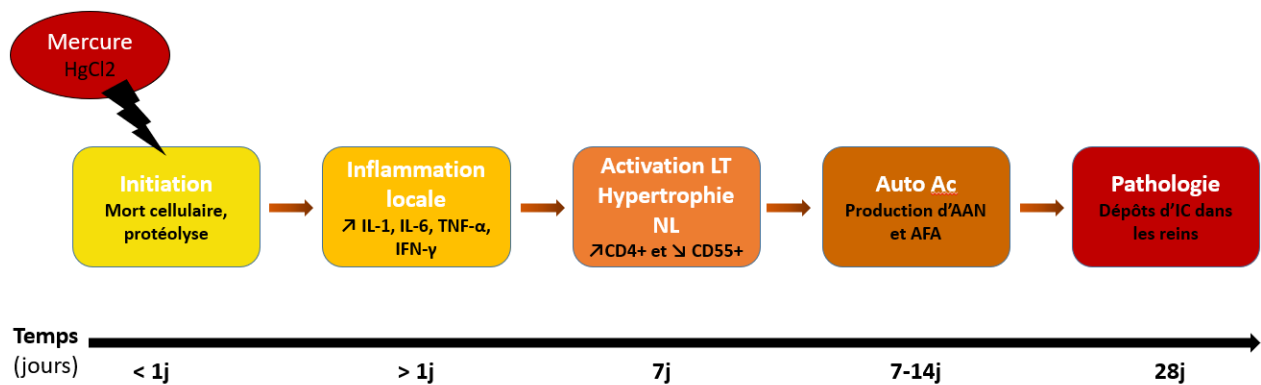


Figure 12 : Mécanismes connus d'induction de l'auto-immunité par le mercure inorganique chez les souris, d'après Pollard *et al.*, 2019

NL = Nœud lymphatique
IC = Immuns-complexes

L'impact du mercure sur les animaux sauvages est peu étudié. Les études portant surtout sur des modèles d'animaux en laboratoire afin de mieux comprendre la pathogénie sur l'humain. Cependant, une étude de Kennedy *et al.* (2021) sur des jeunes lions de mer de Steller a montré une corrélation négative entre le nombre de lymphocytes de ces jeunes et la concentration sanguine en mercure. L'effet immunosuppresseur préalablement évoqué est donc possiblement aussi présent chez des animaux sauvages exposés au mercure dans leur habitat naturel. Das *et al.* montrent en 2008 que le méthyl mercure impacte les PBMCs de phoques communs avec une baisse de prolifération et d'activité des lymphocytes. Les mammifères marins étant particulièrement exposés au mercure du fait d'une forte bioaccumulation, ces résultats amènent à penser que les différents mécanismes aujourd'hui reconnus chez l'humain pourraient être transposés à ces animaux sauvages. L'auto-immunité induite par le mercure mise en évidence sur les souris et l'humain n'est pour le moment pas réellement mise en évidence sur des animaux en milieu naturel.

e. Le cuivre

Le cuivre est un métal lourd qui est aussi un oligo-élément nécessaire au bon fonctionnement de certaines enzymes via les réactions de réduction/oxydation. Il est mis en jeu dans les mécanismes d'absorption, les flux cellulaires ainsi que le transport intracellulaire (Briffa *et al.*, 2020). Cependant, à des concentrations dépassant l'homéostasie cuprique, celui-ci devient alors toxique. Ce métal est très utilisé par l'humain notamment dans les engrais et pesticides, dans les fils, tuyaux, matériels de cuisine, pièces de monnaie ou pour la préservation du bois ou des tissus (Briffa *et al.*, 2020). Chez l'animal, l'absorption intestinale de cuivre est variable, environ 50% chez les monogastriques (porcin, carnivores...) mais bien plus faible chez les ruminants (Tissier, 2020). Deux types d'intoxication au cuivre existent :

- Une intoxication aiguë après ingestion massive de cuivre principalement via des contaminations de la nourriture (bouillie bordelaise à base de sulfate de cuivre utilisée comme antifongique par exemple) ou par des médicaments contenant du cuivre (traitement du piétain des ovins). Le cuivre engendre une irritation et une nécrose avec des troubles digestifs aigus et une mort rapide (Tissier, 2020).
- Une intoxication chronique avec accumulation de cuivre dans l'organisme notamment au niveau hépatique. L'origine est souvent alimentaire avec des erreurs de complémentation de

la ration ou des contaminations de pâtures (épandage de lisier porcin) ainsi que des carences en molybdène ou en soufre avec lesquels le cuivre entre en compétition (une carence de l'un engendre un excès de l'autre). Cette intoxication se caractérise plutôt par une crise d'ictère lorsque le cuivre ne peut plus être stocké par le foie en raison d'une nécrose des hépatocytes (Tissier, 2020).

Chez l'humain, ces deux types d'intoxication existe aussi avec des symptômes similaires ainsi qu'une hémolyse, de la fatigue, des insomnies et de l'agitation avec anxiété. Les principales sources d'apport en cuivre sont par l'alimentation et l'eau de boisson.

Ainsi, le cuivre est un métal lourd dont la toxicité est différente des autres métaux cités précédemment puisqu'il est à la fois un toxique et un oligo-élément, au contraire de l'arsenic, du cadmium et du plomb. Il est donc à la fois essentiel au bon fonctionnement du système immunitaire et en particulier des neutrophiles et monocytes (Maggini *et al.*, 2007) mais il peut à plus hautes doses, engendrer des dysfonctionnements. La dose recommandée de cuivre pour les volailles (poules) d'élevage est de 4 mg/kg (Liu *et al.*, 2020). Au-delà, l'étude de 2020 de Liu *et al.*, a montré que pour des doses administrées de 300 mg/kg, les effets du cuivre sur le système immunitaire étaient proches de ceux de l'arsenic avec des lésions histologiques de la bourse de Fabricius, une augmentation de l'expression des ARNm des cytokines IL-2, IFN γ , IL-4 et IL-17 ainsi qu'une diminution de celle d'IL-10 au sein de la bourse de Fabricius. Un excès de cuivre engendre des dysfonctionnements de l'immunité adaptative humorale et cellulaire avec une baisse de lymphoprolifération et de production d'Ac (Pocino *et al.*, 1990). Cependant, peu d'études ont été effectuées sur le sujet en raison probablement des forts signes cliniques qu'engendre une intoxication aiguë ou chronique au cuivre.

D'autres métaux lourds sont impliqués dans des modifications du système immunitaire comme le nickel par exemple qui produit des réactions allergiques mais aussi une cytotoxicité cellulaire (Das *et al.*, 2019) ou un excès de zinc qui engendre une diminution des activités de phagocytose de l'immunité innée (Wang *et al.*, 2022).

f. Synthèse

Dans l'environnement, l'exposition aux métaux lourds a lieu avec plusieurs d'entre eux à des concentrations qui varient selon le lieu de vie. Les êtres vivants sont souvent exposés à des mélanges de différents métaux plus ou moins accompagnés d'autres polluants. Il est donc souvent difficile d'établir les corrélations entre les expositions aux polluants et l'effet sur le système immunitaire lorsqu'on étudie des populations sauvages, cela expliquant le peu de données bibliographiques sur la faune sauvage actuel. Certains de ces métaux lourds ont des effets qui se synergisent entre eux et rendent alors l'exposition plus délétère. Kim *et al.* étudient en 2020 l'association d'exposition entre le cadmium et le nickel. Ils mettent en évidence qu'à de faibles concentrations de nickel et de cadmium n'induisant normalement pas de baisse de viabilité des cellules, l'association nickel et cadmium engendre une diminution de la viabilité des cellules. Des modifications de sécrétions de cytokines comme une diminution d'IL-12 et une augmentation de TNF- α en défaveur de la voie Th1 sont aussi mises en évidence. Liu *et al.* étudient en 2020 l'association de l'arsenic et du cuivre et son impact sur la bourse de Fabricius des poules. Les résultats mettent en évidence que les effets des métaux étudiés séparément sont d'autant plus importants quand on les associe. Ces effets comprennent une diminution en taille de la bourse de Fabricius et une modification des profils cytokiniques et de l'expression de certains récepteurs des cellules immunitaires. *A contrario*, certains métaux lourds ont des effets qui s'antagonisent. Pabis *et*

al. montrent en 2018 que le zinc, même à faible dose, permet de contrer l'accumulation au sein de l'organisme du cadmium, et donc pourrait réduire l'impact de ce métal.

B. Polluants du sol et de l'eau

Les activités humaines ont engendré le dépôt dans le sol et l'eau de métaux lourds mais aussi d'autres molécules polluantes, qui, tout comme certains métaux lourds, subissent une bioaccumulation et une biomagnification (amplification par le biais de la chaîne alimentaire) au sein des animaux, notamment marins (Chormare et Kumar, 2022 ; Gui *et al.*, 2014).

a. Les retardateurs de flamme bromés et les polychlorobiphényles

Les retardateurs de flamme bromés sont des molécules ajoutées à des produits afin de réduire leur propension à s'enflammer. Ces mélanges sont notamment utilisés dans les produits textiles, plastiques et équipements électroniques. Il en existe plusieurs types avec notamment les diphenyléthers polybromés (PBDE) ou les polybromobiphényles (PBB) dont l'utilisation en Union Européenne (UE) est régulée à ce jour en raison de leur risque sur la santé humaine (EFSA, 2021). Les polychlorobiphényles (PCB) sont aussi des molécules utilisées en industrie et permettant une isolation et une stabilité des composés (ANSES, 2012). Ces molécules font partie des polluants organiques persistants (POP) précédemment cités. Ils sont, et ont été, très utilisés et sont maintenant trouvés partout au sein des sédiments avec notamment des études menées en Europe, au Japon et en Amérique du Nord. Les concentrations semblent en augmentation et ces polluants, de par leur bioaccumulation et biomagnification, mettent en danger les animaux exposés ainsi que l'humain par le biais de la chaîne alimentaire (de Wit, 2002).

Les espèces sauvages les plus atteintes par ces polluants sont les espèces marines au sein desquels la bioaccumulation est très importante. Celle-ci a été très étudiée dans différents endroits du globe, particulièrement en Chine où ces polluants sont relâchés dans l'eau en grandes quantités (Beineke *et al.*, 2005 ; Chormare et Kumar, 2022 ; Gui *et al.*, 2014 ; Wu *et al.*, 2008). L'impact de ces molécules sur le système immunitaire a été étudié sur les mammifères marins. Beineke *et al.* étudient en 2005 l'impact de ces différents polluants sur les organes lymphoïdes de 61 marsouins communs capturés ou échoués dans la mer Baltique, les eaux norvégiennes et islandaises. Leurs résultats mettent en avant une atrophie thymique et une déplétion lymphoïde splénique corrélées à un taux de PCB et PBDE plus élevés chez les individus atteints. Cependant, ces individus étaient aussi ceux avec le statut médical le plus altéré. Une autre étude sur des phoques communs effectuée en 2005, met en évidence une diminution de la phagocytose ainsi que de la quantité de lymphocytes et de l'activité des lymphocytes T, en lien avec la quantité de PCB dans le sang (Mos *et al.*, 2006). Globalement, il ressort de la littérature une altération de l'immunité innée et adaptative chez les animaux marins étudiés mais les mécanismes exacts de l'impact de ces modifications sur leur santé et leur durée de vie sont encore méconnus (voir figure 13). Il semble cependant, que les animaux avec des taux élevés de PCB et PBDE dans le sang présentent plus souvent un état de santé altéré (Desforges *et al.*, 2016 ; Lehnert *et al.*, 2019 ; Ross *et al.*, 1996).

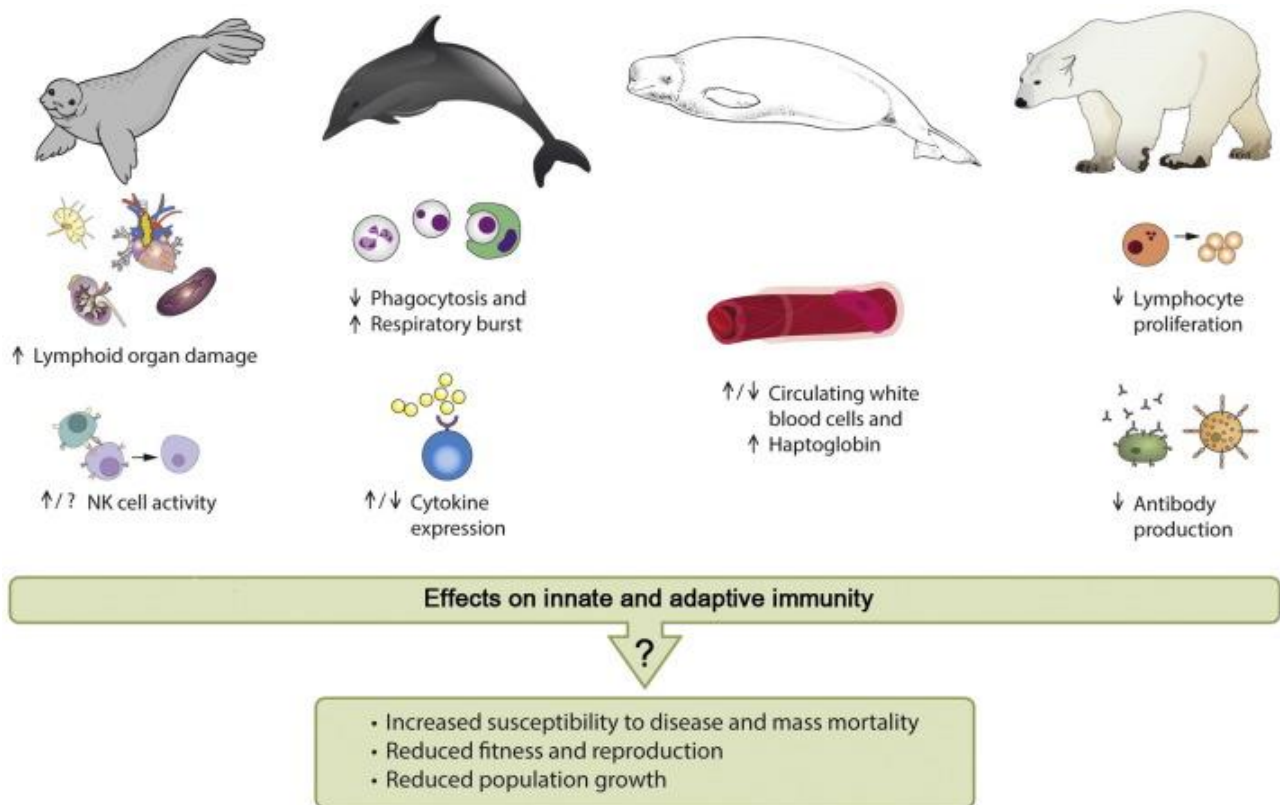


Figure 13 : Bilan des effets sur le système immunitaire des mammifères marins des polluants aquatiques (principalement le PCB mais aussi les PBDE, les métaux lourds notamment le mercure et les composés perfluorés), d'après Desforges *et al.*, 2016

b. Pesticides

Les pesticides sont utilisés par l'humain pour éviter les contaminations fongiques, les destructions par les insectes et les plantes adventices de leurs cultures. Il existe différentes molécules utilisées comme pesticides avec entre autres : les pesticides organophosphorés, organochlorés (notamment le dichlorodiphényltrichloroéthane DDT), les carbamates, l'atrazine ou encore les pyréthriinoïdes (Lee et Choi, 2020). Ceux-ci s'accumulent dans les sols et les eaux puis sont rejetés dans l'océan. Tout comme les composés PBDE et PCB, certains de ces pesticides subissent une bioaccumulation voire une biomagnification, dans la faune aquatique (Ogbeide *et al.*, 2015 ; Skarphedinsdottir *et al.*, 2010). Des études ont montré un lien entre le contact avec certains pesticides et la présence de rhinite et d'asthme chez les agriculteurs, premiers humains exposés à ces pesticides (Hoppin *et al.*, 2009 ; Slager *et al.*, 2010). Ces pesticides ont donc un impact sur le système immunitaire qui sera détaillé par la suite selon les différentes molécules pesticides utilisées par l'humain.

L'atrazine est un herbicide qui n'est plus autorisé d'emploi en UE depuis 2005, mais toujours utilisé dans d'autres pays notamment les Etats-Unis où il est l'un des principaux contaminants de l'eau et entraîne une exposition chronique (Lee et Choi, 2020 ; Thueson *et al.*, 2015). L'atrazine diminue l'immunité innée chez l'humain avec une diminution de la capacité des cellules NK à lyser les cellules-cibles (Rowe *et al.*, 2007) et une altération de la maturation des cellules dendritiques en diminuant notamment le nombre de récepteurs CMH I (Pinchuk *et al.*, 2007). Sur l'immunité adaptative, des études sur des souris ont mis en évidence une diminution de la réponse cellulaire et une apoptose des lymphocytes T sans impact sur les lymphocytes B (Karrow *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2016). Une étude de Jia *et al.* en 2015 sur 150 grenouilles exposées à différentes concentrations

d'atrazine, a montré une diminution des lymphocytes par apoptose via les récepteurs Fas. Ces récepteurs se trouvant sur les lymphocytes T et B mais aussi sur les cellules NK et les monocytes, l'effet de l'atrazine sur le système immunitaire semble donc bien toucher à la fois l'immunité innée et adaptative.

Les carbamates sont des insecticides anticholinestérasés, ils peuvent induire un empoisonnement avec un syndrome cholinergique fatal. Sur le système immunitaire, les carbamates sont étudiés actuellement pour une potentielle molécule médicamenteuse immunosuppressive utilisée chez l'humain lors de maladie auto-immune médiée par les lymphocytes T. En effet, les carbamates semblent modifier la signalisation pour la prolifération et la sécrétion de cytokines des LT par action sur une enzyme kinase spécifique des lymphocytes nommée Lck (Martin *et al.*, 2006).

Les organophosphorés quant à eux sont des insecticides qui subissent une bioaccumulation et biomagnification dans les océans (Skarphedinsdottir *et al.*, 2010). Ils sont immunomodulateurs avec une action sur les LT et les cellules NK. Une stimulation est rapportée à faible concentration alors qu'à forte dose, la molécule a plutôt un effet immunosuppresseur (Li *et al.*, 2004 ; Noworyta-Glowacka *et al.*, 2014). Dans l'étude de Zabrodskii *et al.* en 2013 sur des rats, l'activité de phagocytose des neutrophiles ainsi que la sécrétion des cytokines IL-1 β , IL-6 et TNF α étaient significativement diminuées par l'administration sous-cutanée d'organophosphorés (Zabrodskii *et al.*, 2013).

Le propanil est un herbicide, utilisé notamment dans les plantations de riz. Les études effectuées sur des rongeurs afin d'étudier l'impact sur le système immunitaire, rapporte une altération par cette molécule de l'immunité innée et adaptative avec une immunosuppression. En effet, cette molécule semble induire une myélotoxicité et une atrophie thymique entraînant une diminution de la réponse adaptative. Ces modifications semblent corrélées avec une augmentation des glucocorticoïdes endogènes, molécules produites lors de stress par l'organisme et entraînant une immunosuppression (Cuff *et al.*, 1996 ; Rosa *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'exposition au propanil de rongeurs induit une diminution de la production de cytokines IL-6 et TNF α par les macrophages et donc une diminution de leur activité (Frost *et al.*, 2001 ; Ustyugova *et al.*, 2007 ; Xie *et al.*, 1997).

Chez l'humain, les études montrent que de nombreux pesticides sont associés à des désordres du système immunitaire et favorisent des affections notamment le développement de cancers (prostate, colon, poumons etc...) mais aussi le développement d'allergies (asthme, hypersensibilité de contact) et de maladie auto-immunitaire. Cela invite à penser que chez les animaux sauvages ou domestiques en contact avec ces pesticides, une augmentation du risque de cancers et d'allergies suite à des altérations du fonctionnement normal du système immunitaire peut aussi être observée.

c. Xénoœstrogènes

Les xénoœstrogènes sont des molécules pouvant se fixer sur les récepteurs aux œstrogènes et imitant leurs actions. Cette catégorie de polluants comprend différentes molécules, dont certaines ont déjà été citées précédemment (l'atrazine, les PCBs), et d'autres comme des pesticides tels que le DDT, l'arochlor et le lindane, ou encore des plastifiants comme les phtalates ou le bisphénol A (BPA) (Sultan *et al.*, 2001). Leur affinité pour les récepteurs aux œstrogènes ER α et ER β est 1 000 fois plus faible que celle de l'œstradiol mais peut induire des effets endocrines similaires (Kuiper *et al.*, 1998).

L'exposition de l'humain à ces molécules a été récemment beaucoup étudiée principalement en raison de la présence du BPA dans de nombreux plastiques, notamment les biberons pour enfants. Ces molécules sont un véritable enjeu de santé publique en raison de l'impact qu'elles ont sur la fertilité. En effet, de nombreuses études ont montré le lien entre l'exposition *in utero* aux xénoestrogènes et une diminution de la fertilité des mâles (Aravindakshan *et al.*, 2004b, 2004a ; Luconi *et al.*, 2001). Elles favoriseraient aussi l'apparition de certains cancers, notamment le cancer du sein chez la femme. Cependant, à ce jour, cette hypothèse est controversée car appuyée sur des études *in vitro* uniquement (Buterin *et al.*, 2006 ; Darbre, 2006). Les animaux sont aussi affectés par ces molécules. Beaucoup de xénoestrogènes se retrouvent notamment dans les eaux et subissent alors une bioaccumulation non négligeable (Williams *et al.*, 1998). Les études montrent en effet un impact sur la faune aquatique avec une diminution de la qualité du sperme des poissons et une altération de la vitellogenèse (Aravindakshan *et al.*, 2004a ; Sumpter et Jobling, 1995). Les reptiles, tels que les crocodiles ou tortues dont la différenciation sexuelle est très labile, sont un marqueur de l'exposition de la faune sauvage à ces molécules (Guillette *et al.*, 1995).

Les xénoestrogènes ne modulent pas uniquement la différenciation et le développement des organes sexuels. Ils induisent aussi des modifications du système immunitaire. Sur des souris traitées avec du BPA, Sugita-Konishi *et al.* (2003) montrent une diminution de la phagocytose des neutrophiles ainsi qu'une diminution du nombre de macrophages et lymphocytes sur le site de l'infection à *Escherichia coli* par rapport au groupe contrôle (Sugita-Konishi *et al.*, 2003). Les xénoestrogènes inhibent aussi la dégranulation et le chimiotactisme des neutrophiles (Tou et Urbizo, 2008). Sur l'immunité adaptative, les études mettent en évidence une augmentation du risque de réponses allergiques et d'auto-immunité. En effet, les résultats de différentes études s'accordent à dire que les xénoestrogènes entraînent une stimulation des voies Th1 et Th2 anormale accompagnée d'une diminution du nombre de lymphocytes T régulateurs, expliquant le risque accru d'auto-immunité (Iwata *et al.*, 2004 ; Yan *et al.*, 2008 ; Yoshino *et al.*, 2004). Les xénoestrogènes, de par leur action imitant l'œstradiol, entraînent une sécrétion de prolactine. Cette molécule, à la fois hormone et cytokine, régule le système immunitaire lors de la gestation pour contrôler la sélection des lymphocytes B auto-réactifs. Il a été prouvé que l'hyperprolactinémie était en lien avec de nombreuses affections auto-immunes notamment par sa proximité avec un gène impliqué dans la synthèse des molécules du CMH I (Arango *et al.*, 2017 ; Borba *et al.*, 2018 ; Shelly *et al.*, 2012). Une élévation de la sécrétion d'IgE et d'IL-4 est aussi démontrée, l'IgE étant responsable de réactions allergiques (Lee *et al.*, 2003, 2002).

Ainsi, les polluants xénoestrogènes ne sont pas seulement un problème de santé publique humaine mais aussi un problème pour la faune sauvage et les animaux domestiques de par leur capacité à réduire la fertilité de ceux-ci mais aussi car il est probable que chez les animaux aussi, ils favorisent les allergies et maladies auto-immunitaires.

d. Gaz et pétrole non conventionnels

Les gaz et pétrole sont dits non-conventionnels quand leur extraction ne fait pas appel à des techniques utilisées usuellement. La limite entre conventionnel et non conventionnel est donc variable selon les auteurs (U.S. Energy Information Administration, 2023). Cependant, l'appellation « non-conventionnel » est souvent associée avec l'extraction de gaz par fracturation hydraulique. Cette extraction vise à récupérer le gaz emprisonné dans des roches schisteuses en les fracturant par injection d'un mélange d'eau, de sable et de différents produits chimiques (Carpenter, 2016). Le processus est décrit dans la figure 14. Ces produits sont estimés à plus de 750 molécules différentes

dont 200 environ ont été retrouvées dans les eaux usées, de surface et des nappes phréatiques autour des puits de forage (Elsner et Hoelzer, 2016 ; Waxman *et al.*, 2011). Certains de ces contaminants sont problématiques pour le réchauffement climatique mais surtout pour la santé publique comme par exemple le méthane ou le radium (Osborn *et al.*, 2011 ; Rowan et Kraemer, 2012). L'extraction entraîne aussi la fuite de composés chimiques dans l'air dont certains tel que le benzène, le formaldéhyde et le sulfure d'hydrogène dépasse les recommandations d'exposition vis-à-vis de la santé et des risques de cancers chez l'humain (Macey *et al.*, 2014). Peu d'études portent sur l'impact que ces activités ont sur les animaux. Cependant, les conséquences de ces substances sur l'humain sont probablement proches de celles sur ces animaux exposés.

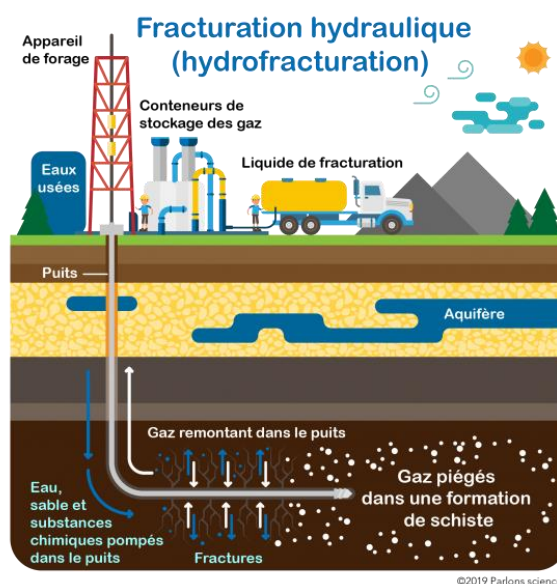


Figure 14 : Schéma expliquant le principe de la fracturation hydraulique. Source : Singh, 2019

Parmi les différents produits chimiques utilisés dans cette méthode, un mélange de 23 molécules a été mis en évidence comme présentant des risques de perturbation du système immunitaire, notamment car certains sont très proches de certaines hormones et peuvent perturber leurs fonctionnements. Ces composés ont des activités agonistes et antagonistes des hormones suivantes : œstrogènes, progestérones, testostérone, hormones thyroïdiennes et glucocorticoïdes (Kassotis *et al.*, 2016, 2016). Ce mélange de 23 produits présent dans le liquide d'extraction du gaz de schiste a été utilisé pour étudier l'impact sur le système immunitaire d'animaux pouvant être en contact mais aussi sur les humains qui y sont potentiellement exposés. Une exposition à faible dose de ce mélange sur des souris gestantes puis en lactation, a montré des modifications du système immunitaire à l'âge adulte sur leur descendance. Les effets étaient plus visibles sur les femelles avec une diminution du nombre de précurseurs des leucocytes au sein de la moelle osseuse, ainsi qu'une diminution des LTCD8 en périphérie. Lorsque ces souris présentent des maladies provoquées au cours de l'étude (virus de l'influenza A, asthme et encéphalomyélite auto-immunitaire), celles-ci possèdent une réponse immunitaire anormale et une progression de la maladie plus rapide notamment chez les femelles par rapport au groupe contrôle (Boulé *et al.*, 2018). Sur des amphibiens du genre *Xenopus*, des observations similaires sont rapportées avec une diminution des populations spléniques de leucocytes et lymphocytes B et T ainsi qu'une diminution de la réponse immunitaire face à une infection virale. Ces effets sont observés à des doses faibles du mélange et sont moins prononcés mais toujours présents avec uniquement 6 des 23 molécules

du mélange (Robert *et al.*, 2019, 2018). L'impact sur la faune autour de ces puits de forages reste à élucider à ce jour. Cependant, au vu des résultats sur les animaux de laboratoire et à l'actuelle pollution de l'air et de l'eau, cet impact sur la faune sauvage est à ce jour très probable.

e. Micro plastiques

La pollution par les plastiques est devenue un véritable problème mondial. Ceux-ci contaminent les sols mais surtout les océans en s'accumulant à travers les différents océans du globe. En 2010, il a été estimé une production de 275 millions de tonnes métriques de déchets plastiques par 192 pays étudiés se situant sur les côtes océaniques. C'est environ 4,8 à 12,7 millions de tonnes métriques qui ont été estimées rejetées dans les océans par ces pays avec des variations selon les qualités de traitement de déchets et la taille de la population du pays (Jambeck *et al.*, 2015). En 2014, après plusieurs expéditions en mer pour collecter des informations, Eriksen *et al.* ont estimé la quantité de plastiques polluant les océans à 5,25 trillions de particules pesant au total jusqu'à quasiment 270 000 tonnes, voir figure 15. L'impact sur les animaux de ces plastiques est indéniable avec environ 267 espèces d'animaux marins touchés par l'ingestion ou par un enchevêtrement dans ces plastiques (Laist, 1997). Cependant, peu d'informations sont rapportées sur les plastiques microscopiques ingérés par les animaux et sur leurs effets en particulier sur le système immunitaire. Ces plastiques polluants sont classés selon leur taille en macroplastiques, mésoplastiques, microplastiques et nanoplastiques. Il n'y a pas de consensus sur les valeurs définissant les seuils de cette classification mais les microplastiques sont souvent définis comme de taille inférieure à 5 mm. Les nanoplastiques eux sont de taille nanométrique avec un seuil inférieur à 20-100 nm. Les microplastiques peuvent avoir différentes formes notamment en fibres, fragments ou sphéroïdes. Ils sont soit primaires, c'est-à-dire rejetés par l'humain (industrie et cosmétiques) sous forme de microplastiques, ou secondaires après dégradation de macroplastiques ou mésoplastiques par des procédés naturels de dégradation (Hirt et Body-Malapel, 2020 ; National Oceanic and Atmospheric Administration, 2023). Ces microplastiques sont composés de polymères dont les plus courants sont le polypropylène, polyéthylène et polyvinylchloride (PVC) (Browne *et al.*, 2011) et d'additifs pour prolonger leur durée de vie et résistance dont certains ont été cités précédemment comme les retardateurs de flammes bromés (PBDE), le bisphénol A, les phtalates ou encore des pigments de coloration dont la toxicité n'est pas encore bien établie (Blackburn et Green, 2022 ; Hirt et Body-Malapel, 2020).

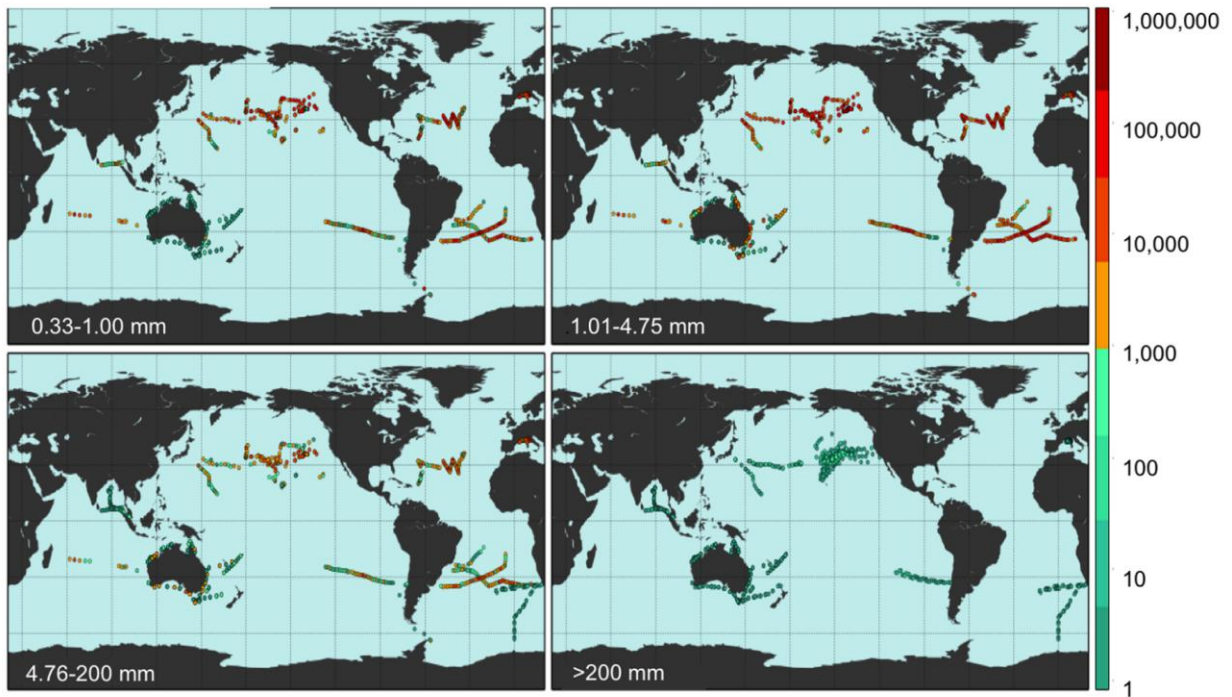


Figure 15 : Densité des plastiques selon leurs différentes tailles autour du globe d'après Eriksen *et al.*, 2014

La toxicité des microplastiques est imputable à plusieurs facteurs (Andrady, 2011). Tout d'abord, l'action des additifs utilisés pour aider à la conservation de ces plastiques. Il a été vu précédemment l'impact sur le système immunitaire des xénoœstrogènes tel que le bisphénol A ou les phtalates ainsi que des retardateurs de flammes bromés. Ensuite, les microplastiques peuvent capter des molécules présentes dans l'eau notamment des métaux lourds (Brennecke *et al.*, 2016 ; Holmes *et al.*, 2012 ; Rochman *et al.*, 2014) ou des polluants organiques persistants (POP) (Rios *et al.*, 2007), polluants qui contiennent le PCB et le PBDE précédemment cités et dont l'impact sur le système immunitaire est démontré. Enfin, ces microplastiques ont une toxicité inhérente qui est mise en évidence lors du contact avec les différents organes. Différentes études se sont intéressées à l'impact de ces micro et nanoplastiques sur les animaux et notamment marins. Les études sur des invertébrés marins comme les moules ou les oursins, ont montré que ces animaux qui filtrent l'eau de mer, présentaient des changements dans leur réponse immunitaire lorsqu'ils sont au contact des plastiques. Les invertébrés ne possèdent pas d'immunité adaptative mais uniquement une immunité innée très développée, principalement médiée par des cellules nommée hémocytes (Canesi et Procházková, 2014). Lorsque ces hémocytes sont mis en contact avec différentes concentrations de nanoplastiques, une diminution de la phagocytose et une augmentation de l'activité lysosomale dose-dépendante ont été mises en évidence. De plus, à forte dose (50 µg/mL), une cytotoxicité avec induction de l'apoptose des cellules immunitaires a lieu (Canesi *et al.*, 2015). L'étude de Détrée et Gallardo-Escárate en 2018 vise à comprendre la réaction, ainsi que la potentielle adaptation, de ces invertébrés à l'exposition aux microplastiques. Ainsi, après avoir mis en contact des moules avec des microplastiques pendant 18 jours, ils ont mis en évidence une exacerbation des protéines de stress et de l'inflammation lors de ce premier contact. Une apoptose ainsi qu'une augmentation non-anticipée des protéines de l'inflammation et de stress est mise en évidence pendant la période de récupération, qui était de 28 jours, après le premier contact de 18 jours. Enfin, ils mettent en évidence

une « mémoire » du contact avec les microplastiques chez les moules avec une réponse de stress et d'inflammation moins forte lors de la réexposition (Détrée et Gallardo-Escárate, 2018).

Sur l'immunité innée, les microplastiques semblent activer les neutrophiles avec une augmentation de leur concentration sanguine (Park *et al.*, 2020) ainsi que de leur dégranulation lorsqu'ils sont mis en contact *in vitro* (Greven *et al.*, 2016). Sur les macrophages de souris, le contact avec des nanoplastiques entraîne une altération du métabolisme lipidique de ceux-ci qui accumulent des vacuoles de lipides impliquant une diminution de leur activité (Florance *et al.*, 2021).

Sur l'immunité adaptative, une diminution de la concentration de lymphocytes circulants dans le sang est mise en évidence sur des souris exposées à de fortes doses orales de microplastiques. Une augmentation des IgA est mise en évidence et proposée comme marqueur de l'exposition à ces plastiques. De plus, une altération de la population lymphocytaire splénique est mise en évidence avec une dérégulation de la balance LTCD4/LTCD8 en faveur des LTCD4 (Park *et al.*, 2020). Cette altération de la balance en faveur des LTCD4 est retrouvée dans d'autres études, associée notamment à une diminution des cellules NK dans le placenta de souris gestantes (Hu *et al.*, 2021) ou encore à une mise en évidence d'une diminution des LT Th17 et Treg spléniques chez des souris (Li *et al.*, 2020). Li *et al.* (2022) mettent en évidence *in vitro* que les nanoplastiques induisent un stress oxydatif et des dommages aux mitochondries ainsi qu'une apoptose des lymphocytes spléniques de souris. De plus, ils mettent en évidence que le contact avec les nanoplastiques altère la différenciation en LTCD8 ainsi que l'expression des cytokines des LTCD4.

Au niveau organique, l'impact des microplastiques a été beaucoup étudié sur le tube digestif car la première voie d'exposition pour l'humain est l'ingestion de ces microplastiques par la nourriture (poissons, mollusques et crustacés notamment) ainsi que par l'eau de boisson (Hirt et Body-Malapel, 2020). Les études sur des souris et des poissons-zèbres mettent en avant une dysbiose intestinale avec perturbation du microbiote en faveur d'une monopopulation de bactéries ainsi qu'une inflammation locale avec augmentation de l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires (Jin *et al.*, 2018 ; Li *et al.*, 2020 ; Sun *et al.*, 2021).

f. Synthèse

La pollution des sols et de l'eau est donc un enjeu majeur pour l'immunité des animaux et notamment des animaux aquatiques, particulièrement exposés aux modifications de leur environnement. D'autres polluants ont un impact sur la faune et notamment les rejets des industries textiles contenant de nombreux pigments dont les effets sont encore peu étudiés sur les animaux. Ceux-ci modifient leur milieu de vie avec un impact sur la photosynthèse des plantes aquatiques par coloration de l'eau et donc un impact sur la chaîne alimentaire (Khan et Malik, 2018) mais ils ont aussi potentiellement des effets carcinogènes notamment les pigments azoïques (National Toxicology Program, 1986). De plus amples études sont à réaliser pour mettre en évidence l'impact sur le système immunitaire de ces pigments et ainsi leur potentielle carcinogénicité. Certains polluants préalablement cités, peuvent aussi être retrouvés dans l'air et avoir une action par inhalation comme par exemple les nanoparticules de plastiques (Hirt et Body-Malapel, 2020).

C. Polluants de l'air

Chez l'humain, en Europe, la pollution de l'air serait responsable de 6% de la mortalité annuelle et pour la moitié imputable à de la pollution émise par les véhicules motorisés. Cette pollution entraîne surtout des affections respiratoires telles que des bronchites chroniques chez les adultes, des bronchites chez les enfants ainsi que des crises d'asthmes (Künzli *et al.*, 2000). L'impact sur les

animaux domestiques est moins étudié mais pourtant rapporté. Dans l'étude de Reif et Cohen, (1970), les chiens vivant en milieu urbain présentaient significativement plus de lésions pulmonaires que les chiens de campagnes pour les tranches d'âge entre 7 et 12 ans.

a. Composition et effets connus sur la santé

L'air pollué est constitué de différents composants (Albright et Goldstein, 1996 ; Glencross *et al.*, 2020) :

- Des gaz tels que l'ozone (O₃), le monoxyde de carbone ou d'autres composés organiques volatils.
 - Des liquides en suspension dans l'air comme l'oxyde d'azote.
 - Des particules en suspension dans l'air nommée PM pour *particulate matter* en anglais. Ces particules en suspension présentent différentes tailles et sont classées en PM₁₀ pour les particules de diamètre inférieur à 10 µm, PM_{2,5} inférieur à 2,5 µm et UFPM, particules ultrafines. Ces particules sont un mélange de différents éléments de proportions variables, (voir figure 16). Elles comprennent (Airparif, 2022 ; Ghio *et al.*, 2012 ; Glencross *et al.*, 2020) :
- Des sels minéraux : nitrates, sulfates, carbonates, chlorures...
 - Du carbone suie.
 - Des métaux tels que le fer en majorité mais aussi du vanadium, chrome, nickel ou encore du cuivre.
 - Des composés organiques avec notamment les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH).
 - Des substances biologiquement actives tels que des endotoxines bactériennes comme les lipopolysaccharides (LPS).

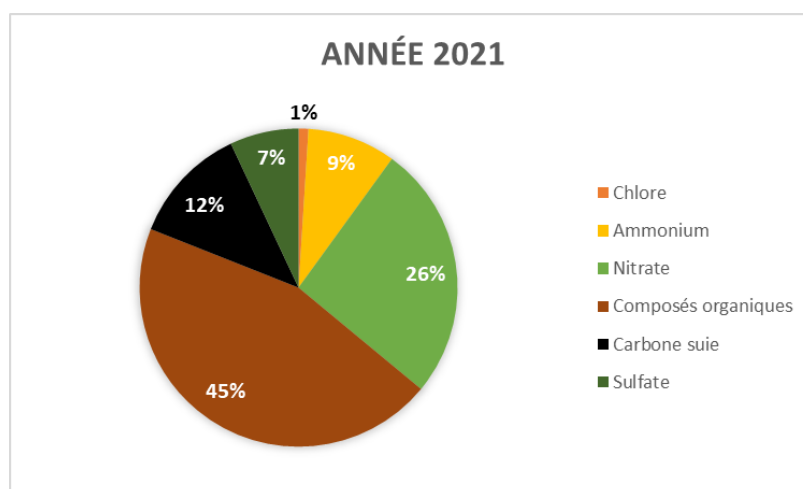


Figure 16 : Composition chimiques des PM_{2,5} mesurées à la station de Paris 1^{er} les bains en 2021, modifié d'après Airparif, 2022

L'exposition de jeunes souris à ces particules fines, montre au niveau pulmonaire local, une immunosuppression avec une augmentation de la quantité de LTreg entraînant une diminution de la voie Th2. De plus, ces mêmes souris étaient particulièrement prédisposées à l'apparition d'allergies une fois adultes, avec une augmentation du taux d'IgE localement (Saravia *et al.*, 2014).

Cette pollution de l'air est en grande partie liée aux émissions du trafic routier par les véhicules motorisés mais une autre grande cause de pollution sont les feux de forêts. En effet, avec

le contexte climatique actuel, les feux de forêts ont tendance à s'intensifier. Aux Etats-Unis, les feux de forêts représentaient en 2011, 20% des émissions de particules dans l'air (US Environmental Protection Agency, 2018). Les scientifiques prévoient une augmentation de ces feux et donc de leur production de particules entre 20 et 100% selon les scénarios de changement climatique (Hurteau *et al.*, 2014). Ces feux de forêts produisent une fumée constituée des polluants cités précédemment dans des proportions variables selon les végétaux brûlés (Naeher *et al.*, 2007). Ils produisent en particulier des PM_{2,5} ainsi que des PAH (Black *et al.*, 2017). L'exposition des animaux à ces feux de forêts induit des changements dans leur immunité. Une étude sur des PBMCs de jeunes macaques a montré une modification de la sécrétion des cytokines selon le sexe de l'individu lorsqu'ils sont mis en contact avec du LPS ou flagelline. Chez les femelles, la sécrétion d'IL-8 est diminuée, alors que chez les mâles, la sécrétion d'IL-6 est diminuée. L'expression de différents gènes de la voie de transmission des TLR est aussi modifiée. De plus, ces macaques présentaient une fois adultes, des capacités pulmonaires réduites par rapport au groupe contrôle (Black *et al.*, 2017). Sur des vaches laitières américaines, particulièrement exposées aux feux de forêts californiens, la fumée de ces feux entraîne une augmentation des éosinophiles et basophiles sanguins, une diminution des neutrophiles sanguins associés à une diminution de la production laitière. Cependant ces effets sont concomitants avec un taux d'humidité et de température de l'air élevé qui peuvent aussi modifier les paramètres physiologiques de ces animaux (Anderson *et al.*, 2022). La pollution de l'air, qu'elle soit causée par le trafic routier, les industriels ou les feux de forêts, présente donc de potentielles altérations du système immunitaire qui seront détaillés par la suite en fonction des différents constituants.

b. Hydrocarbures aromatiques polycycliques et dioxine

Les PAH sont un ensemble de molécules émises dans l'air suite à une combustion. L'humain y est exposé par inhalation des émissions des véhicules motorisés, des fumées de bois ou de cigarettes mais aussi par l'alimentation en consommant des aliments sur lesquels se sont déposés les molécules présentes dans l'air ambiant ou des aliments trop cuits. Ces PAH peuvent aussi parfois passer la barrière cutanée (Centers for Disease Control and Prevention, 2022). Les animaux y sont sûrement aussi exposés par inhalation de fumée et de pollution routière ou par ingestion d'aliments contaminés. La dioxine ou 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) est un composé chimique de la même famille que le PCB préalablement cité. Elle est émise lors de la combustion de déchets ou de bois, utilisée pour les étapes de blanchissement de papiers ou émise lors de la production de certains pesticides. Ces deux polluants, PAH et dioxine, sont des molécules qui se lient sur un récepteur nommé récepteur aryl hydrocarbure (AhR). Ce récepteur est un facteur de transcription de certains gènes permettant la détection du rythme circadien ou de l'hypoxie (Gu *et al.*, 2000). C'est un récepteur exprimé en particulier sur des cellules immunitaires, notamment dans les organes lymphoïdes périphériques, ainsi qu'au niveau des cellules immunitaires de la peau, des poumons et des intestins. L'AhR est présent en majorité dans les LT Th17, peu dans les LTreg et absent des LT Th1 et Th2. Il semble être présent sur certains types de LB mais la compréhension exacte de son effet est encore à déterminer. C'est un récepteur qui est aussi exprimé par les macrophages et cellules dendritiques (Stockinger *et al.*, 2014).

Lors de la fixation des polluants tels que les PAH ou la dioxine sur le récepteur AhR, des mécanismes pro-inflammatoires sont mis en avant comme une exacerbation du prurit (démangeaisons) et de l'inflammation cutanée lors de dermatite atopique chez l'humain (Hidaka *et al.*, 2017). Par son action sur les LTreg et LT Th17, le récepteur AhR présente aussi un rôle dans la régulation des maladies auto-immunitaires. Ainsi, il est mis en évidence que lors de la fixation de

certaines polluants, une exacerbation de la voie Th17 avec une augmentation de la sécrétion d'IL-17 est à l'origine d'une exacerbation du modèle d'encéphalite dysimmunitaire utilisé sur des souris. Au contraire, la fixation de la dioxine provoque un effet inverse avec une augmentation de l'action des LTreg et donc une diminution de l'expression de la maladie (Quintana *et al.*, 2008). Chez l'humain, les PAH favorisent aussi l'apparition d'asthme, notamment chez les jeunes, par le biais des réactions de stress oxydatif qu'ils génèrent (Wang *et al.*, 2017), en dérégulant la balance Th1/Th2 en faveur de Th2 (Hew *et al.*, 2015) et par l'effet de AhR sur les macrophages et neutrophiles engendrant une inflammation locale dans les poumons (Podechard *et al.*, 2008).

Cependant, le contact avec ces polluants peut aussi engendrer une immunosuppression. Sur les macrophages, la dioxine provoque une diminution de la sécrétion des cytokines permettant le chimiotactisme et l'angiogenèse ainsi qu'une diminution des capacités d'adhérence et de la formation des pseudopodes (élongation du cytoplasme cellulaire permettant la capture des pathogènes) (Li *et al.*, 2021). Une suppression de l'immunité humorale et cellulaire systémique est aussi mise en évidence avec le TCDD. Sur des souris, une involution thymique est rapportée lors du contact avec le TCDD ainsi qu'une plus grande sensibilité aux infections (Kerkvliet, 1995). L'action du TCDD sur le thymus est médiée par le récepteur AhR qui entraîne la production de LT supresseurs, bloquant la différenciation des LT en LT cytotoxiques (Nagarkatti *et al.*, 1984). Sur les LB, le TCDD provoque une diminution de la prolifération et de la production des Ac par les LB différenciés. La molécule ne possède pas d'action sur les LB non différenciés (Morris *et al.*, 1993). Cette suppression de l'immunité humorale est aussi présente chez la souris. Après une ingestion de particules de silice contaminée avec du TCDD, la production d'IgM est réduite chez ces animaux exposés (Kaplan *et al.*, 2011).

Ainsi, la dioxine et les PAH sont des polluants engendrant des modifications immunologiques importantes favorisant l'apparition de maladies auto-immunitaires graves, l'apparition de formes sévères d'asthme, surtout après une exposition des jeunes, et une immunosuppression qui est pour l'instant surtout étudiée sur des animaux de laboratoire. L'impact sur les animaux sauvages et domestiques est encore très peu documenté à ce jour.

c. Ozone

L'ozone est un gaz instable composé de trois atomes d'oxygène. Il se situe principalement dans la stratosphère et compose « la couche d'ozone » qui protège la Terre des rayons ultra-violet (UV) produits par le soleil. L'ozone se trouve aussi dans la troposphère, partie de l'atmosphère dans laquelle se trouvent les animaux et les humains. L'ozone de la troposphère est un polluant formé avec les molécules rejetées majoritairement par le trafic routier, mais également par certaines industries. Sa synthèse met en jeu l'oxyde d'azote et les composés organiques volatils et est catalysée par les rayonnements UV (figure 17). En conséquence, des brouillards dits « smog » peuvent se former au-dessus des villes par beau temps et forte chaleur (Airparif, 2019). Les composés organiques volatils forment une grande famille de molécules très volatiles et composées d'au moins un atome de carbone. Ces composants comprennent par exemple les alcanes, éthers, aldéhydes, alcènes etc... (Airparif, 2021). L'ozone est un composé irritant et est à l'origine de réaction de stress oxydatif dans l'organisme. Ce stress oxydatif existe pour des niveaux d'ozone équivalents à ceux présents dans la pollution de l'air des zones urbaines et cause des dysfonctionnements au niveau des mitochondries entraînant des lésions cellulaires (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2013). L'impact de l'ozone sur la santé publique mondiale est inférieur à celle des

PM avec 0,2 millions de morts associées à l'ozone contre 3,1 millions associées au PM en 2010 (Lim *et al.*, 2012).

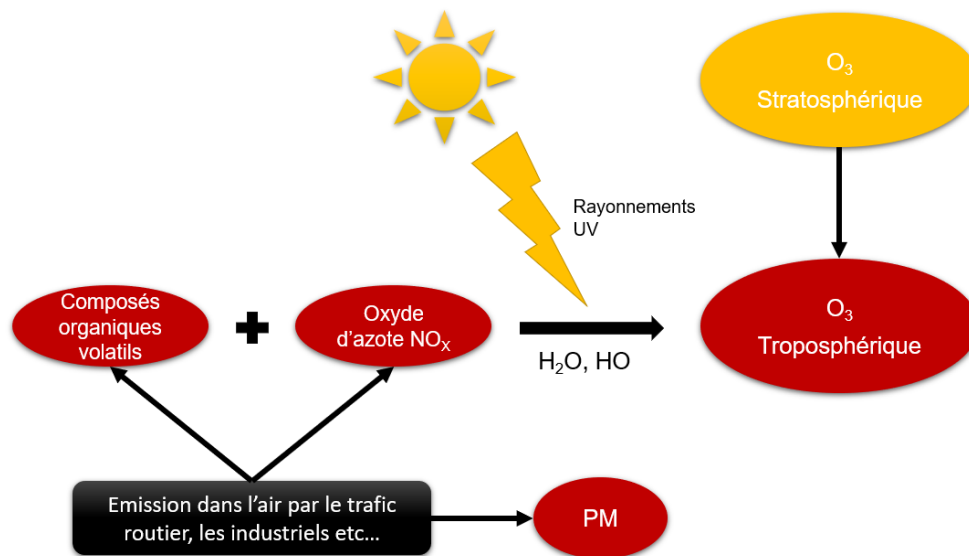


Figure 17 : Mécanismes de formations de l'ozone troposphérique, polluant de l'air d'intérêt majeur en santé publique. Modifié d'après Zhang *et al.* (2019)

Lors d'une exposition courte à l'ozone, une inflammation neutrophilique locale nasale et pulmonaire est mise en évidence chez les animaux (Harkema *et al.*, 1987 ; Hotchkiss *et al.*, 1989) mais aussi chez l'humain (Aris *et al.*, 1993). Une diminution du nombre de macrophages dans les lavages bronchoalvéolaires est aussi notée (Hatch *et al.*, 1994). Ainsi, l'exposition à l'ozone entraîne une sensibilité augmentée à certains pathogènes respiratoires par diminution des défenses locales (notamment des macrophages alvéolaires) et une augmentation de la prévalence d'asthme en particulier chez les plus jeunes. Dans l'étude de Ong *et al.* (2016), une exposition d'un jour à une concentration d'ozone, proche de celle d'un « smog », entraîne sur les souris étudiées une inflammation neutrophilique avec production de cytokines pro-inflammatoires, comme IL-6, TNF α et IL-1 β . En neuf jours, cette inflammation suit la voie Th2 avec une production d'IL-5 et IL-10 ainsi qu'une augmentation de la prévalence en éosinophiles localement.

Les effets d'une exposition plus chronique, telle que celle que la pollution peut engendrer (hors période très élevée de concentration d'ozone), sont moins clairs. Cependant, il semble que le stress oxydatif causé par l'ozone engendre l'augmentation en composés oxydatifs qui provoquent des modifications dans les voies de signalisation de la réponse immunitaire adaptative. Cela favoriserait notamment le développement de certaines affections auto-immunes telles que le lupus (Strickland *et al.*, 2015) et la polyarthrite rhumatoïde (Pradhan *et al.*, 2019) ainsi que des maladies neuro-inflammatoires et neurodégénératives (Velázquez-Pérez *et al.*, 2021). En effet, cette augmentation des composés oxydatifs entraîne une perturbation dans la sélection des lymphocytes auto-réactifs ainsi qu'une perturbation de la population de LTreg, dont le nombre diminue. Ces LTreg ne sont alors plus en capacité de réguler la population de lymphocytes auto-réactifs. Une augmentation de la voie Th17 est aussi constatée avec une augmentation de la cytokine IL-17 associée à cette voie (Rivas-Arancibia *et al.*, 2022).

Ainsi, l'exposition à l'ozone entraîne non seulement une inflammation locale respiratoire avec augmentation de la sensibilité à des affections telles que les rhinites ou l'asthme, mais elle peut aussi favoriser des affections plus systémiques, notamment auto-immunes.

d. Synthèse

La pollution de l'air, d'origine naturelle (feux de forêt) ou anthropique (transports, industrie), provoque donc des modifications du système immunitaire. Ces modifications sont principalement une inflammation pulmonaire locale et un contexte systémique pouvant favoriser des maladies auto-immunitaires et neurodégénératives. L'impact sur les animaux est cependant mal connu à ce jour et reste à déterminer. À un échelon plus restreint, la pollution de l'air est associée à la pollution au domicile ou dans les lieux publics par le tabac. Si à ce jour il est clair que le tabagisme engendre d'importantes affections, notamment cancéreuses, sur l'humain, l'impact du tabagisme passif semble tout aussi nocif pour les personnes exposées que pour les animaux domestiques exposés.

3. Le tabagisme et le système immunitaire

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2022, le tabagisme a engendré 8 millions de morts sur l'année dont 1,7 millions imputés au tabagisme passif (OMS, 2022). Nos animaux domestiques y sont sensibles, comme le montre l'étude préalablement citée de Diane Ka à propos de l'impact du tabagisme passif sur la dermatite atopique canine (Ka, 2011). Dans cette partie sera exposé ce qu'il est connu à ce jour de l'impact du tabagisme, notamment passif, sur le système immunitaire.

A. Composition de la fumée émise par les cigarettes

La composition d'une cigarette est complexe car elle varie selon les industriels, les additifs, les filtres utilisés et selon les médiums de tabac (pipes, cigares etc...). La composition de la fumée émise par la cigarette varie par rapport à la composition initiale car la combustion entraîne la formation de nouveaux composés. Cette combustion est effectuée à des températures différentes selon le type de fumée émis. Il existe trois courants de fumée lors de la combustion d'une cigarette (voir figure 18) : (Borgerding et Klus, 2005 ; Génération sans tabac, 2019 ; Wirth *et al.*, 2005)

- La fumée primaire, émise à haute température, lorsque le fumeur inspire sur sa cigarette.
- La fumée secondaire qui est composée de la fumée émise par la cigarette entre deux inspirations. Elle est émise à plus basse température, générant des composés différents de la fumée primaire.
- La fumée tertiaire, définie différemment selon les auteurs comme celle exhalée par le fumeur ou comme celle se déposant sur l'environnement du fumeur (habits, meubles etc...).

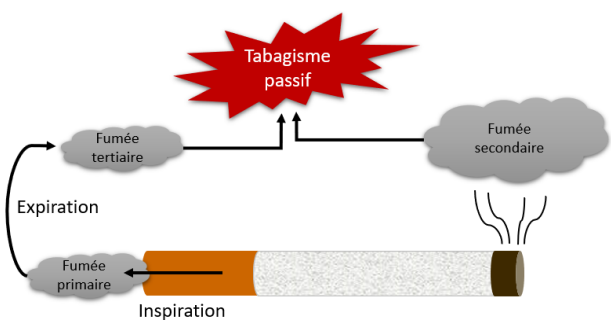


Figure 18 : Les différents courants de fumée émis par une cigarette à l'origine du tabagisme passif (Schéma personnel)

Le tabagisme passif se divise en deux types d'exposition : l'exposition du fœtus aux composés de la fumée primaire, secondaire et tertiaire auxquels est exposé la mère, et l'exposition des personnes de l'entourage du fumeur consistant en l'inhalation des fumées secondaire et tertiaire

diluées dans l'air ambiant. Ces fumées sont composées d'une phase gazeuse et d'une phase particulaire dont les particules sont surtout des PM_{2,5} ou de taille inférieure. Les particules présentes dans la fumée secondaire sont plus fines que celles de la fumée primaire (California Environmental Protection Agency: Air Resources, 2005). De très nombreuses molécules sont mises en jeu parmi lesquels sont retrouvés : (Baker *et al.*, 2004 ; Borgerding et Klus, 2005 ; California Environmental Protection Agency: Air Resources, 2005 ; Das *et al.*, 2019)

- La nicotine, responsable de l'effet d'addiction au tabac.
- Des gaz comme le monoxyde de carbone, l'oxyde d'azote, le cyanure d'hydrogène...
- Des nitrosamines ou nitrophénols résultants de réactions avec les oxydes d'azote.
- Des PAH comme le Benzo[a]pyrène entre autres.
- Des métaux lourds comme le cadmium, le nickel, le mercure, le plomb, le chrome ou l'arsenic.

En raison des différences de températures de combustion ainsi que de la proportion temporelle de formation des fumées (la cigarette continue de produire de la fumée secondaire entre chaque consommation formant de la fumée primaire), la fumée secondaire est majoritaire dans le tabagisme passif et contient de plus grandes concentrations de composés nocifs que la fumée primaire. Par exemple, la fumée secondaire contient environ dix fois plus de PAH (Lodovici *et al.*, 2004), trois fois plus de nicotine, quatre à sept fois plus de cadmium (Borgerding et Klus, 2005) que la fumée primaire. Philip Morris est le fondateur de l'entreprise Philip Morris International et créateur de nombreuses marques de cigarettes dont Marlboro. L'entreprise Philip Morris International possédait un laboratoire d'expérimentation pour mieux comprendre l'impact du tabac dans les années 1980. Les résultats de ces études sont longuement restés confidentiels jusqu'à la création d'une base de données de leur laboratoire *Institut für Biologische Forschung* (INBIFO). Dans ces études menées sur des souris, il est montré que la fumée secondaire émise par les cigarettes est quatre fois plus toxique par grammes de PM que la fumée primaire (Schick et Glantz, 2005).

Les différents constituants des cigarettes ont des effets démontrés sur la santé publique humaine aussi bien des enfants et que des adultes. Ces effets touchent différents appareils de l'organisme et notamment l'arbre respiratoire, l'appareil cardiovasculaire et la fertilité ainsi que le développement fœtal. L'exposition au tabagisme passif engendre aussi un risque augmenté de développer des cancers et notamment des cancers du poumon ou des sinus (voir tableau 3). Il paraît donc essentiel de limiter l'exposition aux fumées secondaires émises en limitant la consommation de cigarette en intérieur, même au domicile et dans le secteur public. L'impact du tabagisme passif sur les animaux, notamment domestiques car exposés à la fumée émise par leurs maîtres, est à ce jour très méconnu.

Tableau 3 : Impacts sur la santé du tabagisme passif associés à l'exposition des adultes et enfants, modifié d'après Board, 2005

Association causale avec le tabagisme passif	
Effets sur le développement fœtal	Poids diminué à la naissance et lors de la croissance Mort subite inexplicquée du nourrisson (MSIN) Accouchement précoce
Effets respiratoires	Bronchite et pneumonie sur les enfants Asthme chez adultes et enfants Symptômes respiratoires chroniques chez les enfants Irritation des yeux et du nez chez l'adulte Otite moyenne sur les enfants
Effets cancérogènes	Cancer du poumon Cancer des sinus Cancer du sein sur les femmes pré-ménopausées
Effets cardiovasculaires	Maladie cardiaque Maladie coronarienne chronique Altérations des propriétés des vaisseaux sanguins
Suspicion d'association causale avec le tabagisme passif	
Effets sur la reproduction et le développement fœtal	Avortements Diminution des capacités cognitives et comportementales de l'enfant Sensibilisation aux allergies Diminution de la fonction pulmonaire Diminution de fertilité et fécondabilité
Effets cardiovasculaires	Augmentation du risque d'accident vasculaire cérébral (AVC) chez les adultes
Effets respiratoires	Augmentation du risque de mucoviscidose Symptômes respiratoires chroniques chez les adultes
Effets cancérogènes	Cancer du col de l'utérus Cancer du cerveau et Lymphomes chez les enfants Cancer nasopharyngé Globalement toutes formes de cancer de l'adulte et de l'enfant

B. Effets connus du tabagisme sur le système immunitaire

De nombreux composés dont les effets sur le système immunitaire ont été détaillés précédemment, sont présents dans la fumée inhalée par le fumeur passif. On y retrouve notamment des métaux lourds tels que le cadmium, le plomb, le mercure etc... et des PAH. Il est donc aisé de suspecter un impact sur le système immunitaire des animaux inhalant la fumée du tabagisme passif. Au vu des affections induites par le tabagisme passif chez l'humain, la fumée semble avoir un effet aussi bien local respiratoire, en favorisant des troubles respiratoires chroniques et de l'asthme, que

systémiques. À ces composés s'ajoute la nicotine, molécule responsable de l'effet d'addiction au tabac et dont l'effet sur le système immunitaire ne semble pas être anodin.

a. Effets de la nicotine sur le système immunitaire

La nicotine présente des effets d'addiction au tabac par libération de dopamine (Kodirov, 2017), molécule du circuit de la récompense qui engendre une sensation de bien-être à son consommateur. Cependant, il ne s'agit pas de son seul effet sur l'organisme. Les études se contredisent sur un effet pro-inflammatoire et un effet anti-inflammatoire de la nicotine. En effet, elle semble permettre le chimiotactisme des neutrophiles lorsqu'elle est à des concentrations 100 fois supérieures à celle du plasma d'un fumeur, concentrations pouvant se retrouver dans les fluides issus d'un lavage broncho-alvéolaire. À de plus faibles concentrations, elle sensibilise les neutrophiles aux actions de chimiotactisme d'autres molécules se trouvant dans les poumons, entraînant alors une inflammation locale (Totti *et al.*, 1984). Ces résultats sont appuyés par ceux de Rao *et al.* (2009) qui montrent que, sur des souris exposées à la nicotine, les neutrophiles adhèrent plus facilement à l'épithélium vasculaire. Cela leur permet d'effectuer la diapédèse pour atteindre les tissus pulmonaires.

Le système immunitaire est influencé par de nombreux paramètres externes et internes à l'organisme. Un de ces paramètres internes a été vu précédemment, il s'agit du taux de cortisol sanguin qui est immunosuppresseur à dose élevée. Il existe aussi une voie nerveuse du contrôle de l'immunité par le nerf vague et le système orthosympathique autonome ; cette voie est nommée cholinergique anti-inflammatoire et elle met en jeu un récepteur nicotinique particulier, le récepteur $\alpha 7$ -acétylcholine ($\alpha 7nAChR$). La nicotine se fixe sur ce récepteur qui est présent sur de nombreuses cellules et notamment les cellules inflammatoires comme les monocytes, macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B et T ainsi que sur les fibroblastes (Sato *et al.*, 1999 ; Westman *et al.*, 2009). La fixation sur ce récepteur entraîne différents mécanismes. Sur les monocytes et macrophages, la fixation de la nicotine sur $\alpha 7nAChR$ entraîne une diminution de l'expression de certains récepteurs permettant la communication entre cellules immunitaires (CD14 et TLR4) et une diminution de la sécrétion de TNF α , cytokine pro-inflammatoire (Hamano *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2003). La nicotine, lorsqu'elle se fixe sur $\alpha 7nAChR$, favorise aussi l'activité des cellules LTregs (Wang *et al.*, 2010), diminue les voies des LT Th1 et Th17 mais favorise la voie Th2 (Nizri *et al.*, 2009 ; Zhang et Petro, 1996). L'effet de la nicotine sur les maladies auto-immunes semble cependant varier selon le moment de l'exposition et le développement de la maladie. En effet, lorsque la nicotine est utilisée après le début du développement de la maladie, celle-ci a tendance à en diminuer les symptômes de la maladie comme par exemple dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde (Yu *et al.*, 2011), l'encéphalomyélite auto-immunitaire (Gao *et al.*, 2014) ou encore la recto-colite hémorragique, une des formes sévères de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (Sandborn, 1999). En revanche, lorsqu'ils exposent des souris à la nicotine avant le développement de la maladie rhumatoïde puis stoppent l'administration, Yu *et al.* (2011) montrent que les symptômes sont aggravés avec notamment une augmentation de la sécrétion d'IL-17 et IFN γ et une augmentation de la présence d'auto-anticorps. Cependant, ces résultats ne sont pas comparés avec un développement de la maladie sans exposition à la nicotine. Ainsi, la nicotine présente des propriétés anti-inflammatoires intéressantes pour le traitement de certaines affections auto-immunitaires. Cependant, cette immunosuppression peut être délétère sur des individus sains qui auront alors plus de mal à se défendre contre des agressions externes. Sur des souris et des rats, Sopori *et al.* (1998) montrent que l'exposition à la nicotine permet, grâce à son effet anti-inflammatoire systémique, aux animaux de vivre plus longtemps que ceux non exposés lorsqu'ils

sont soumis au virus Influenza. Cependant, ceux-ci possédaient beaucoup plus de virus dans leur organisme que les animaux non exposés à la nicotine.

Si son impact a été beaucoup étudié par le biais d'injection, de patch ou sur des personnes fumeuses, l'effet de la nicotine sur des personnes non-fumeuses par exposition à la fumée émise par les cigarettes, n'est pas clairement démontré. Cependant, la nicotine constitue un composant majeur de cette fumée et il est possible de supposer que les personnes subissant du tabagisme passif sont aussi exposées à ses effets aussi bien anti-inflammatoires systémiques que pro-inflammatoires locaux.

b. Effets du tabac sur l'immunité innée

L'exposition à la fumée de tabac est donc liée à l'exposition de nombreuses molécules différentes, ici seront abordés les effets globaux sur le système immunitaire inné de cette fumée. Tout d'abord, l'exposition à la fumée de tabagisme passif entraîne sur des souris une angiogenèse pulmonaire avec une augmentation locale du nombre de vaisseaux sanguins (Rao *et al.*, 2009). L'angiogenèse des vaisseaux sanguins est en particulier médiée par des cytokines pro-inflammatoires, ce qui laisse penser que le contact avec la fumée du tabac provoque une inflammation locale pulmonaire. Dans leur étude, Rao *et al* montrent aussi que les leucocytes adhèrent plus facilement à l'endothélium vasculaire lors d'une exposition à de la fumée de tabac et donc présentent une diapédèse facilitée. Dans les études menées par INBIFO, le laboratoire de l'entreprise Philip Morris International, il a été mis en évidence sur des rats, une augmentation du nombre de neutrophiles et macrophages dans les poumons des animaux exposés à la fumée de cigarette (Institut Für Biologische Forschung *et al.*, 1985b, 1986). Ces études tendent à montrer une augmentation locale pulmonaire de l'immunité innée.

Chez le chien, différentes études ont été menées pour étudier l'impact pulmonaire local de la fumée du tabac. Une augmentation du nombre de neutrophiles dans les examens de lavages broncho-alvéolaires est mise en évidence, signant une inflammation locale dont la résolution est d'autant plus longue que le temps d'exposition l'est (Abrams *et al.*, 1988). Sur des beagles de laboratoire, des modifications du tissu pulmonaire liées à l'inflammation locale sont déterminées lors d'exposition à la fumée avec une altération de l'escalator muco-ciliaire, mécanisme de défense primaire pulmonaire qui permet de remonter les pathogènes ou poussières vers les voies nasales, et une inflammation péri bronchique et périvasculaire dans l'ensemble du parenchyme pulmonaire (Park *et al.*, 1977). Les macrophages alvéolaires, principales cellules inflammatoires de défense au niveau local pulmonaire, présentent aussi des altérations avec une augmentation de leur mobilité cytoplasmique mais une diminution de leur capacité de phagocytose des pathogènes (Park *et al.*, 1977 ; Yamaya *et al.*, 1989).

Chez le chat, très peu d'études ont été réalisées. Il s'agit cependant d'une espèce très sensible à l'asthme et aux affections respiratoires obstructives (Trzil, 2020). Dans l'étude de Kolahian *et al.* (2014), aucune différence significative n'est présente sur la numération formule sanguine (NFS) des chats exposés à la fumée de cigarette. Cependant, une augmentation locale des cellules inflammatoires est mise en évidence avec une augmentation nette du nombre de macrophages, éosinophiles, neutrophiles et même lymphocytes dans les poumons de ces chats. Une augmentation de l'expression des cytokines IL-8, IL-6 et TNF α est aussi observée. Tout comme chez le chien, une inflammation péri bronchique et périvasculaire est présente chez les chats exposés. Dans leur étude, l'administration de tiotropium, médicament humain anticholinergique pris par voie inhalée avec des propriétés bronchodilatatrices et anti-inflammatoires, entraîne une

diminution nette des lésions pulmonaires et de l'inflammation locale chez ces chats. Ces résultats étant donnés sur un très petit effectif (5 chats exposés, 5 chats exposés puis traités au tiotropium et 5 chats non exposés), les données restent relativement peu fiables et sont à confirmer sur un plus grand échantillon. Elles semblent, cependant, en cohérence avec celles déterminées dans l'espèce canine.

Sur d'autres espèces, les altérations mises en évidence sur les macrophages alvéolaires sont aussi présentes. Chez les macaques rhesus exposés sur la période périnatale, la phagocytose des macrophages alvéolaires est diminuée (Yu *et al.*, 2008). De même, sur les macrophages alvéolaires *in vitro* d'humains, une altération de la capacité à tuer les bactéries une fois phagocytées est mise en évidence (King *et al.*, 1988) ainsi qu'une modification dans la sécrétion des cytokines chez les personnes fumeuses avec notamment une diminution d'IL-6 et TNF α et une augmentation non-significative d'IL-8 (McCrea *et al.*, 1994). Les cellules NK, essentielles dans la lutte contre les cellules cancéreuses notamment, sont moins actives contre des cellules de mélanomes chez les fumeurs que chez les non-fumeurs (Ferson *et al.*, 1979). Sur des souris exposées de manière plus ou moins chronique à de la fumée de cigarettes, des modifications des cellules inflammatoires de l'immunité innée (macrophages alvéolaires) sont retrouvées dans les voies respiratoires. La figure 19 montre que lors de l'exposition à la fumée de cigarette, le nombre de cellules inflammatoires augmente et ce sont les neutrophiles qui prédominent dans les voies aériennes et non les macrophages (Wang *et al.*, 2012).

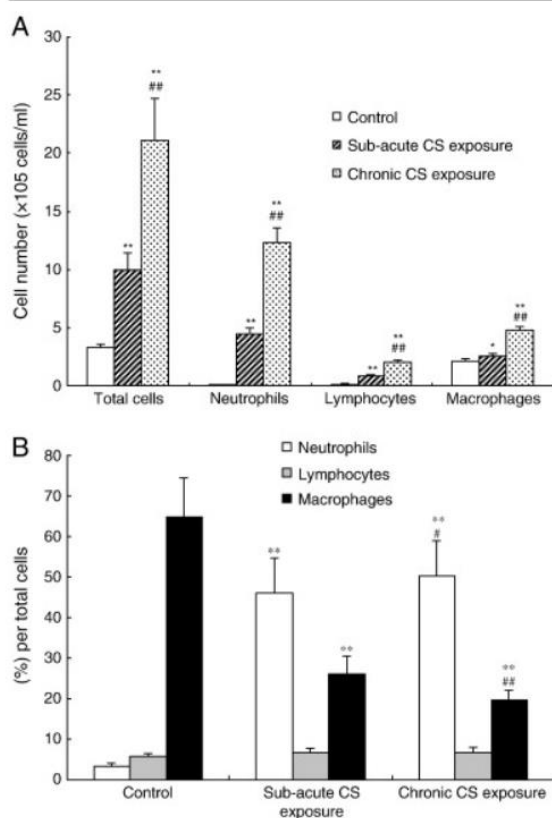


Figure 19 : Marqueurs de l'inflammation dans les voies respiratoires de souris exposées à de la fumée de cigarette 5 jours par semaine pendant 4 semaines pour l'exposition « sub acute » et 24 semaines pour l'exposition chronique. D'après Wang *et al.*, 2012.

A : Nombre de cellules inflammatoires (Totales, neutrophiles, lymphocytes et macrophages) présentes dans les voies aériennes

B : Pourcentage d'un type de cellules inflammatoires par rapport à la totalité des cellules présentes dans les voies aériennes

Ainsi, la fumée de cigarette présente la capacité d'induire une inflammation locale pulmonaire importante avec une infiltration neutrophilique et macrophagique induisant des lésions péri-bronchiques et périvasculaires. Elle provoque aussi une altération de l'escalator muco-ciliaire, premier moyen de défense du poumon contre les pathogènes. S'ajoutent à ces lésions, des modifications dans les capacités de défense des cellules immunitaires, notamment des

macrophages alvéolaires dont la phagocytose et la capacité à éliminer les pathogènes est diminuée. Ainsi, l'exposition à la fumée de cigarette altère les capacités de défense contre les pathogènes et induit des lésions pulmonaires pouvant être à l'origine de maladie respiratoire chronique telle que l'obstruction respiratoire chronique, maladie présente dans nos espèces domestiques.

c. Effet du tabagisme sur l'immunité adaptative

Dans leurs expériences sur des rats menés par le laboratoire INBIFO, il a été mis en évidence que les lymphocytes des rats exposés durant 21 jours à de la fumée de cigarette étaient moins viables. De plus, en différenciant ceux exposés à de la fumée primaire et de la fumée secondaire, les lymphocytes des rats exposés à la fumée secondaire étaient moins viables que ceux exposés à la fumée primaire (Institut Für Biologische Forschung *et al.*, 1985a). L'effet de la fumée de cigarette sur le système immunitaire adaptatif se traduit par une différence dans la balance Th1/Th2 des lymphocytes. En effet, plusieurs études montrent une augmentation de la concentration des cytokines de la voie Th2 et une diminution de celles de la voie Th1, que ce soit localement dans le poumon ou dans les PBMCs du sang. Cette altération a été étudiée sur des jeunes singes exposés à la fumée de cigarette afin d'établir un lien entre le contact avec de la fumée sur des jeunes enfants et l'apparition ou le développement anormal d'allergies (voir figure 20) (Wang *et al.*, 2007 ; Yu *et al.*, 2008).

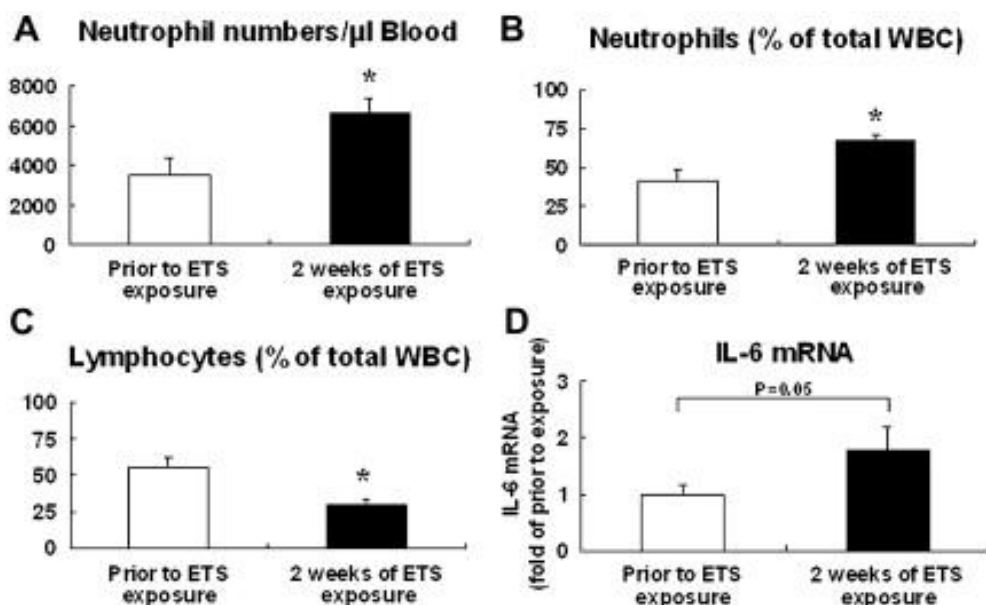


Figure 20 : Comparaison du nombre de neutrophiles, lymphocytes et de la quantité d'ARNm IL-6 dans le sang de jeunes singes de 6 mois avant et après 2 semaines d'exposition à de la fumée de cigarette, d'après Wang *et al.*, 2007

- A : Nombre de neutrophiles par μ L de sang
- B : Pourcentage de neutrophiles parmi les leucocytes du sang
- C : Pourcentage de lymphocytes parmi les leucocytes du sang
- D : Quantité d'ARNm codant pour la cytokine IL-6

La fumée de cigarette possède aussi des effets sur les lymphocytes de la voie Th17. En effet, lors de l'exposition de souris à de la fumée de cigarette, celles-ci présentent une quantité de LT Th17 plus élevée et corrélée avec une augmentation des LTCD8 cytotoxiques. De plus, la cytokine IL-21 produite par les LT Th17 entraîne une augmentation de l'activité des LTCD8 avec plus de lésions pulmonaires d'emphysème induites (Duan *et al.*, 2012). Cette dérégulation de la voie Th17

est aussi mise en évidence sur des souris exposées chroniquement à de la fumée de cigarette pendant 24 semaines. Une augmentation de la quantité de cellules LT Th17 et une diminution des LTreg est mise en évidence sur ces souris localement dans le poumon mais aussi dans le sang (Wang *et al.*, 2012). Cette dérégulation de la balance Th17/Treg peut être en lien avec des affections d'obstruction chronique des voies respiratoires médiée par la cigarette. Sur la production d'anticorps, la cigarette semble avoir différents effets. En comparant des fumeurs et non-fumeurs, Ferson *et al.* (1979) mettent en évidence une diminution d'IgA et IgM dans le sérum des personnes fumeurs. En revanche, lors de affections auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde, une augmentation des lésions et de la présence d'IgA et IgM spécifique de cette maladie sont corrélées avec le statut fumeur du patient (Másdóttir *et al.*, 2000). Une augmentation de la présence d'AAN est aussi mise en évidence chez les personnes fumeuses (Mathews *et al.*, 1973).

Ainsi, l'exposition à la fumée de cigarette engendre aussi bien une inflammation locale pulmonaire avec déplétion des capacités de défenses locales qu'une immunomodulation à l'échelle systémique pouvant favoriser l'apparition de cancers ou de maladies auto-immunitaires.

C. Quid de la e-cigarette ?

Si les effets sur le système immunitaire de la cigarette ont pu être beaucoup étudiés mais reste encore flous à ce jour, les effets des alternatives modernes à la cigarette comme la cigarette électronique ou « e-cigarette » sont très peu connus. Ce type de dispositifs est entré sur le marché américain en 2007 et le recul sur les risques de santé publique lors de son utilisation est encore faible. Le processus de fonctionnement de l'appareil diffère d'une cigarette classique par la génération d'un aérosol en chauffant un liquide rechargeable et dont les goûts, et donc les additifs, peuvent varier. De plus, seule la fumée primaire et tertiaire est produite par le dispositif car il n'y a pas de combustion et l'appareil est activé uniquement quand son utilisateur appuie sur le bouton. L'aérosol produit est composé de différentes molécules dont des particules en suspension (Thiri6n-Romero *et al.*, 2019). La composition de cet aérosol est assez proche de celle la fumée d'une cigarette avec (Cheng, 2014 ; McAuley *et al.*, 2012 ; Thiri6n-Romero *et al.*, 2019) :

- De la nicotine dont la concentration peut varier selon le liquide acheté, voire être absente,
- Du propylène glycol et de la glycérine végétale,
- Des composés organiques volatils comme le formaldéhyde, l'acétone etc...
- Des PAHs,
- Des nitrosamines,
- Des métaux comme le nickel, le chrome, le fer, l'aluminium, le zinc, etc...

Les molécules composant l'aérosol sont cependant en concentrations réduites par rapport à la fumée de cigarette classique et les constructeurs rapportent une absence de monoxyde de carbone (Nayir *et al.*, 2016). Comme la législation de contrôle des liquides de recharge de ces cigarettes est encore en modification, certains fabricants fraudent sur les taux de nicotine indiqués. Par exemple, certains produits vendus comme « sans nicotine » en contiennent tout de même ou encore la présence de certaines autres drogues pour favoriser la consommation (Hadwiger *et al.*, 2010). De plus, les métaux retrouvés dans les aérosols de ces cigarettes sont en concentrations plus importantes ou égales à celles de cigarettes classiques et résulteraient de la haute température appliquée sur la structure de la machine (Williams *et al.*, 2013).

Il n'y a pas de fumée secondaire émise par la cigarette électronique mais Khachatoorian *et al.* (2019) mettent en évidence la présence de dépôts sur le mobilier de fumée émise par des vapoteurs. Le tabagisme passif existe donc aussi pour cette forme de cigarette. Le taux de cotinine (métabolite produit au sein de l'organisme d'une personne en contact avec du tabac) chez des humains exposés à du tabagisme passif pour de la cigarette électronique et de la cigarette standard est similaire (Flouris *et al.*, 2013). Les animaux notamment domestiques peuvent donc aussi être exposés passivement à ces fumées.

Si les effets des cigarettes électroniques sont encore mal connus, une nouvelle maladie respiratoire, la pneumopathie associée à la cigarette électronique (EVALI), a été associée au vapotage en 2019 lors d'une recrudescence de cas humains de détresse respiratoire aiguë. L'origine de cette maladie serait liée à un ajout de vitamine E dans les liquides qui, une fois chauffée et inhalée cause une détresse respiratoire (American Lung Association, 2023 ; Futura et AFP-Relaxnews, 2019). Une augmentation des allergies respiratoires et du risque d'asthme sur des souris est rapportée (Lim et Kim, 2014). De plus, lors du contact avec la fumée, qu'il y ait ou non de la nicotine dans le liquide chauffé, Madison *et al.* (2019) mettent en évidence une altération de l'homéostasie lipidique pulmonaire ainsi que de l'immunité innée localement. Ainsi, les effets de la cigarette électronique ont été étudiés principalement à ce jour localement au niveau pulmonaire et avec de la fumée émise par la machine qui correspond donc à la fumée primaire. L'exposition de cellules pulmonaires ou d'animaux de laboratoire à cette fumée montre une inflammation pulmonaire locale avec une augmentation de la sécrétion de cytokines IL-6, IL-13, IL-1 β , IL-8 (Higham *et al.*, 2018 ; Lerner *et al.*, 2015) et une augmentation de l'inflammation macrophagique (Sussan *et al.*, 2015) et neutrophilique (Higham *et al.*, 2016). Une augmentation locale du nombre de cellules dendritiques et de LTCD4 est aussi rapportée dans la littérature (Szafran *et al.*, 2020). En parallèle de ces effets pro-inflammatoires locaux, une diminution des défenses contre les pathogènes externes est mise en évidence dans l'étude de Hwang *et al.* (2016) avec une diminution de l'activité des macrophages et neutrophiles pour 4 des 6 marques de liquides testées. De plus, cette étude met en évidence une augmentation de la formation de biofilms bactérien et de l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales pulmonaires. Sur des souris, une diminution de l'activité macrophagique de phagocytose des bactéries ainsi qu'une augmentation du titre viral des animaux exposés à la fumée de cigarette électronique sont mis en évidence après 2 semaines d'exposition (Sussan *et al.*, 2015). Higham *et al.* (2018) met en évidence une diminution de la réponse immunitaire vis-à-vis des virus. Ainsi, il est probable que la fumée émise par les cigarettes électroniques ne soit pas anodine, notamment avec des effets pro-inflammatoires pulmonaires et une augmentation de la sensibilité aux infections bactériennes et virales. Cependant, ces effets semblent dépendre des marques utilisées ainsi que de la présence ou non de nicotine dans le liquide (Garcia-Arcos *et al.*, 2016). Les effets systémiques sur le système immunitaire de la fumée de cigarette électronique restent encore peu connus et peu étudiés. Flouris *et al.* (2012) ne montrent pas de changement notable dans le comptage leucocytaire sanguin lors d'exposition à la cigarette électronique alors qu'il est présent pour la cigarette classique. De plus, toutes ces études sont faites sur une exposition à de la fumée émise par la cigarette électronique (fumée primaire) et non pas sur de la fumée émise par le fumeur ou se déposant sur le mobilier (fumée tertiaire) qui peut avoir une composition différente.

D. Synthèse

Le tabagisme est à ce jour connu pour avoir un impact sur la santé humaine et causer plusieurs millions de morts chaque année que ce soit par le tabagisme primaire ou par le tabagisme passif. Son impact sur le système immunitaire est aussi important chez l'humain et les animaux de laboratoire exposés au tabagisme passif. Cependant, l'impact du tabagisme passif sur nos animaux domestiques est beaucoup moins documenté dans la presse scientifique et en particulier l'impact de celui-ci sur le système immunitaire. La partie expérimentale suivante visera à étudier cet aspect sur l'espèce canine.

Deuxième partie

I. Introduction

Les effets et impacts du tabagisme primaire sur la santé humaine sont à ce jour bien connus et causent plusieurs millions de morts par an selon l'OMS (OMS, 2022). Le tabagisme passif, défini comme l'exposition d'une personne non-fumeur à la fumée de tabac, présente aussi des effets sur la santé humaine en favorisant notamment l'apparition de cancers de l'arbre respiratoire et du sein, de maladies respiratoires chroniques (asthme, bronchite et symptômes respiratoires chroniques), de maladies cardiovasculaires et des effets sur le développement fœtal (California Environmental Protection Agency: Air Resources, 2005). Les animaux domestiques sont aussi exposés à ce tabagisme passif par le biais de leur propriétaire. Cependant, l'impact du tabagisme passif sur les animaux domestiques a été peu étudié et en particulier son impact sur leur système immunitaire. Avec la constante modernisation de la médecine vétérinaire, connaître l'impact et les conséquences sur les animaux domestiques du tabagisme passif semblent être d'un intérêt grandissant, notamment pour établir un parallèle avec les conséquences de la pollution en général sur le système immunitaire des animaux et leur résistance aux infections.

A ce jour, il est établi que le tabagisme passif entraîne une exacerbation des troubles cutanés chez les chiens atteints d'atopie, dysrégulation locale de la barrière cutanée et de son système immunitaire local (Ka, 2011). Une inflammation locale pulmonaire importante a aussi été mise en évidence par différentes études chez le chien et une chez le chat avec une très nette augmentation du nombre de cellules inflammatoires, en particulier des neutrophiles, au détriment de l'activité de phagocytose des macrophages alvéolaires et provoquant alors une inflammation péri bronchique et périvasculaire dans tout le parenchyme pulmonaire (Abrams *et al.*, 1988 ; Kolahian *et al.*, 2014 ; Park *et al.*, 1977 ; Yamaya *et al.*, 1989). Les effets sur le système immunitaire adaptatif ont été étudiés sur des souris et des singes principalement et la bibliographie ne permet pas de connaître, à ce jour, l'impact sur les animaux domestiques. Il en ressort sur les souris et singes, qu'une altération des balances lymphocytaires aussi bien locale pulmonaire que systémique, ait lieu. Le tabagisme passif favoriserait la voie Th2 humorale par rapport à la voie Th1 cellulaire ainsi que la voie Th17 avec une augmentation de la quantité de LTCD8 cytotoxiques, entraînant des lésions pulmonaires et diminuerait la régulation immunitaire médiée par la voie Treg (Duan *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2012, 2007 ; Yu *et al.*, 2008).

Si un impact local sur le système immunitaire du tabagisme passif sur les animaux domestiques a été faiblement étudié, l'impact systémique est bien moins connu. Aucune modification de la numération formule sanguine (NFS) n'était visible chez les chats, avec cependant un faible effectif de 5 chats dans chaque groupe étudié (Kolahian *et al.*, 2014). Des modifications des balances lymphocytaires Th1/Th2 et Th17/Treg sont aussi mises en évidence sur des PBMCs de souris et singes (Duan *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2012). Ainsi, le peu de données récentes actuelles ne permet pas de déterminer précisément l'impact systémique immunitaire du tabagisme passif sur nos animaux domestiques.

L'objectif de cette étude est donc de mieux comprendre l'impact systémique du tabagisme passif sur le système immunitaire des chiens de compagnie en étudiant :

- La composition des éléments figurés du sang (NFS) des chiens non exposés et exposés au tabagisme passif,
- L'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF α dans le sang par la méthode d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA),
- Les proportions des différentes populations lymphocytaires et monocytaires circulantes par cytométrie de flux.
- Les concentrations de cotinine dans le plasma des chiens par méthode ELISA. Ce marqueur est issu de la dégradation de la nicotine par l'organisme et permet de quantifier l'exposition au tabac aussi bien chez l'humain que chez les animaux (Flouris *et al.*, 2013). L'intérêt de ce dosage est explicité dans la section II.6.A.

Au vu des données bibliographiques, il est attendu de mettre en évidence une déplétion lymphocytaire mais une augmentation des cellules de l'immunité innée (neutrophiles notamment) au sein de l'hémogramme, une augmentation des cytokines pro-inflammatoires de l'immunité innée IL-6 et TNF α ainsi qu'une diminution de l'immunité adaptative avec une altération de la balance lymphocytaire Th1/Th2 en faveur de Th2. Une concentration plasmatique plus importante de cotinine est aussi attendue dans le groupe « exposés » par rapport au groupe « non exposés ».

II. Matériels et méthodes

1. Recrutement et prélèvement

A. Inclusion dans les cohortes

Le recrutement des chiens pour constituer les cohortes a eu lieu entre novembre 2021 et mai 2022 auprès des étudiants et du personnel de l'Ecole nationale vétérinaire d'Alfort (EnvA). Les critères d'inclusions dans l'étude sont les suivants :

- Chien en bonne santé sans maladie intercurrente rapportée. Ce critère a été contrôlé par le moyen d'un examen clinique lors de l'inclusion,
- Chien entre 1 et 8 ans d'âge afin de comparer des animaux au système immunitaire similaire. En effet une influence de l'âge est rapportée dans la littérature avec une augmentation du nombre de LTCD8 avec l'âge, une diminution du ratio CD4/CD8 et une diminution des LB (Faldyna *et al.*, 2001).
- Chien dont le dernier vaccin date de plus de 3 semaines afin de ne pas influencer les paramètres sanguins par la stimulation vaccinale du système immunitaire,
- Chien vivant en région parisienne afin de garantir une exposition uniforme à la pollution atmosphérique des animaux inclus,
- Chien de plus de 2 kg afin que le prélèvement sanguin ne soit pas délétère pour l'animal,

La validation du protocole par le Comité d'Ethique pour la Recherche Clinique (ComERC) a eu lieu en octobre 2021 (N°2021-07-09), voir annexe 1.

B. Prélèvement sanguin et constitution des cohortes

Avant de réaliser le prélèvement sanguin, un questionnaire d'inclusion est remis au propriétaire (voir annexe 2). Ce questionnaire permet de déterminer si les critères d'inclusions sont validés et permet de connaître l'exposition de l'animal à la cigarette avec une quantification de celle-ci, si cela est réalisable par le propriétaire. D'autres expositions à des composés volatils ayant un potentiel de modification du système immunitaire (fumée de cheminée, bougies, e-cigarette, cannabis etc...) sont aussi identifiées. Un examen clinique de l'animal est ensuite réalisé. Les critères d'inclusions validés,

un consentement est signé par le propriétaire et l'auteur de ce manuscrit. Une prise de sang à la veine saphène externe ou jugulaire est ensuite réalisée avec prélèvement de 2 à 4 mL de sang sur un tube contenant un anti-coagulant, l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA).

Les chiens sont ensuite répartis en deux cohortes. La première cohorte est composée de chiens dits « non exposés » avec une quantification par le propriétaire de 0 cigarettes inhalées au cours des six derniers mois. La seconde cohorte est composée de chiens dits « exposés » avec une quantification de l'exposition en cigarettes par jour.

2. Isolement des PBMCs et du plasma

La prise de sang est ensuite traitée dans l'heure suivant son prélèvement au laboratoire. 200 µL sont prélevés, mis de côté dans un tube Eppendorf et conservés à 4°C pour la réalisation de la NFS. Une centrifugation est ensuite réalisée à 2 500 rotations par minute (rpm) pendant 10 minutes. 800 µL de plasma sont alors prélevés, transférés dans un tube Eppendorf identifié et congelé à -80°C.

Un gradient de Ficoll est ensuite réalisé pour l'isolement des PBMCs selon la méthode décrite par Bøyum en 1968 sur des prélèvements sanguins humains (Bøyum, 1976). L'isolement des PBMCs permet par la suite l'étude des différentes cellules immunitaires lymphocytaires et monocytaires. Pour cela, 2 mL de sang sont dilués au demi avec un tampon phosphate salin (PBS) et déposés doucement sur 3 mL de Ficoll à l'aide d'une pipette. Une centrifugation de ce tube est réalisée pendant 20 minutes à 2 000 rpm après retrait du frein de la centrifugeuse afin d'obtenir une décélération douce. Le tube obtenu à l'issue de cette centrifugation est montré en figure 21. La couronne de PBMCs est prélevée et déposée dans 5 mL de PBS pour effectuer un lavage des cellules. Ce mélange est centrifugé à 1 200 rpm pendant 5 minutes deux fois en éliminant le surnageant entre les deux centrifugations et en ajoutant à nouveau 5 mL de PBS. À l'issue de ces lavages, le culot est ensuite isolé et mélangé avec 1,4 mL de Sérum de Veau Fœtal (SVF) complété avec 5% de diméthylsulfoxyde (DMSO). Ce mélange est alors transféré dans deux ampoules de cryogénéisation, soit 0,7 mL environ par ampoule. Les deux échantillons de PBMCs sont alors identifiés et congelés à -80°C.

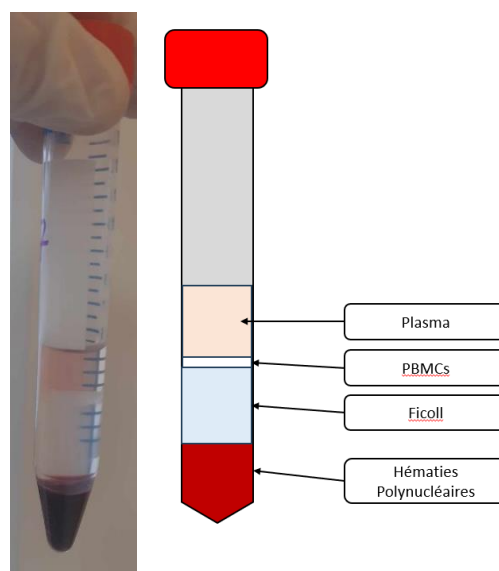


Figure 21 : Image et schéma du gradient de Ficoll obtenu après centrifugation inspiré d'après Bøyum, 1976

3. Numération formule sanguine

Les 200 μL mis de côté avant l'isolement du plasma et des PBMCs ont servi à la réalisation de la NFS sur chaque chien avec l'automate ADVIA 2120S Siemens Hematology System du laboratoire Biopôle de l'EnvA. L'objectif de cette mesure est de déterminer si une différence significative entre les chiens des groupes « exposés » et « non exposés » est présente sur les différentes populations de cellules sanguines. Les valeurs de concentration sanguine des hématies, plaquettes et leucocytes incluant les neutrophiles, éosinophiles, basophiles, lymphocytes et monocytes ont été ainsi mesurées.

4. Etude des leucocytes mononuclés par cytométrie de flux

A. Principe de la méthode par cytométrie de flux

Les différentes populations de leucocytes mononuclées (lymphocytes et monocytes) présentes dans les PBMCs précédemment isolées, sont déterminées par la technique de cytométrie de flux. L'objectif est de comparer, entre les deux groupes étudiés, les proportions des populations monocytaires (monocytes matures et immatures) et lymphocytaires (lymphocytes T et B ainsi que LTCD4 et LTCD8) à l'aide de différents marquages immunologiques. Cela permettra de déterminer si une voie de l'immunité est privilégiée lors d'exposition au tabagisme passif en mettant en évidence des déséquilibres dans le ratio CD4/CD8 par exemple. La technique de cytométrie de flux est très utilisée en médecine humaine ainsi que vétérinaire pour déterminer les phénotypes des cellules étudiées. Elle est aussi en plein développement pour la caractérisation des tumeurs à cellules rondes canine et féline et en particulier des lymphomes (Parys *et al.*, 2023 ; Riondato et Comazzi, 2021).

Le principe de fonctionnement repose sur l'aspiration des cellules en suspension dans une aiguille de diamètre très fin, avec du liquide de gaine qui permet le passage des cellules une par une devant différents lasers, avec une vitesse définie par la machine. Lors du passage dans ce tube, la cellule rencontre donc plusieurs lasers qui permettent l'analyse des caractéristiques de chaque cellule : la granulosité de son cytoplasme, sa taille ainsi que sa fluorescence si des fluorochromes (molécules fluorescentes préalablement attachées à des anticorps liés à la cellule avant son analyse) y sont associés (voir figure 22). Ces caractéristiques sont ensuite retranscrites grâce au système informatique, dans un graphique nommé cytogramme où chaque point représente une cellule et où les axes du graphique sont choisis par l'utilisateur (Givan, 2001).

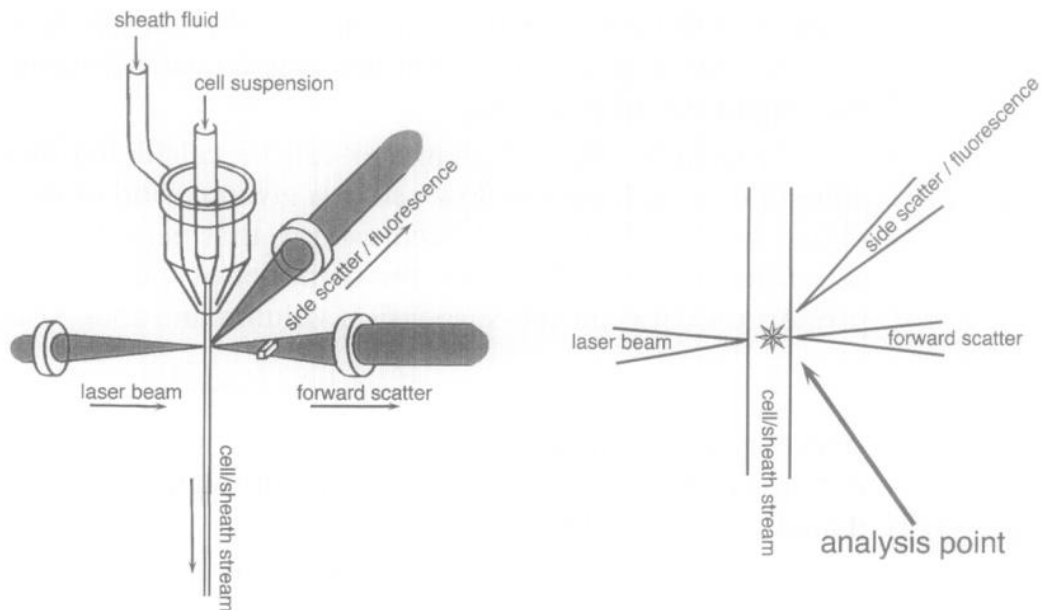


Figure 22 : Représentation schématique du fonctionnement d'un cytomètre de flux comprenant les trois faisceaux lumineux éclairant une cellule. Source : Givan, 2001

Sheath fluid = Liquide de gaine, Laser beam = Faisceau laser,
 Forward scatter = FSC = Mesure de la taille,
 Side scatter = SSC = Mesure de la granulosité
 Analysis point = Point focal d'analyse

Pour l'étude des données obtenues sur ces cytogrammes, une méthode dite de « *gating* » est employée. Le principe de cette méthode repose sur la sélection des populations cellulaires d'intérêt à analyser, par étape en utilisant les différents critères fournis par la machine (granulosité, taille et fluorescence) afin d'atteindre la population cible. Le *gating* permet notamment de s'affranchir des données obtenues à partir de débris cellulaires. Différentes méthodes de *gating* ont été décrites dans la littérature et des consensus ont eu lieu en médecine humaine afin de s'affranchir des variations engendrées par les différentes méthodes (Wood, 1998). En médecine vétérinaire, les principes de *gating* s'appliquent de même avec une adaptation aux particularités des espèces canine et féline (Byrne *et al.*, 2000).

Afin de phénotyper les cellules, des fluorochromes associés à des Ac spécifiques de récepteurs sont ajoutés aux cellules avant leur passage dans la machine. Ainsi, il s'agit de choisir l'Ac adapté aux récepteurs exprimés par la cellule sur laquelle porte l'étude. Le tableau 4 montre les principaux récepteurs exprimés à la surface de la membrane des cellules étudiées au sein de cette étude.

Tableau 4 : Récepteurs spécifiques des leucocytes associés utilisés au sein de cette étude d'après Aniolek *et al.*, 2014 ; Riondato et Comazzi, 2021 ; Weiss et Wardrop, 2010

Récepteurs exprimés	Cellules cibles
CD45	Tous les leucocytes
CD3	Lymphocytes T
CD21	Lymphocytes B matures
CD4	LTCD4 auxiliaires (helper)
CD8	LTCD8 cytotoxiques
CD11b	Cellules myéloïdes
MHCII	Monocytes, Lymphocytes B (CPA)
CD14	Monocytes

B. Préparation des cellules, fixation et marquage

Tout d'abord, les cellules sont préparées pour effectuer leur marquage, c'est-à-dire réaliser leur phénotypage à l'aide d'anticorps couplés à des fluorochromes qui sont spécifiques d'un des marqueurs cités dans le tableau 4. Une ampoule de chaque PBMCs, isolées à partir de chien inclus dans l'étude, est décongelée et déposée dans 5 mL de PBS avant la totale décongélation. Le mélange est centrifugé à 1 200 rpm pendant 5 minutes. Le culot est isolé en jetant le surnageant, 1 mL de paraformaldéhyde concentré à 1% est ajouté et le mélange est laissé à incuber pour 30 minutes sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) à température ambiante. A l'issue de l'incubation, les PBMCs sont dites « fixées » et conservent leur morphologie et les récepteurs à la membrane plasmique pour les étapes de marquage qui vont suivre. 4 mL de solution de PBS adjuvée de 0,5% d'albumine de sérum bovin (BSA) sont ajoutés au mélange à la fin de l'incubation. Une centrifugation est réalisée à 1 200 rpm pendant 5 minutes. A la suite de cette centrifugation, le surnageant est jeté et le culot cellulaire est re-suspendu avec 800 µL de PBS + 0,5%BSA puis un transfert de 200 µL des cellules en suspension est effectué dans 4 tubes de 5 mL préalablement identifié comme « Non marqué », « Mix 1 », « Mix 2 » et « Mix 3 » (voir figure 23). 300 µL de la solution PBS + 0,5% BSA est ajouté dans chaque tube qui sont ensuite centrifugés selon les paramètres précédemment cités. Les différents mélanges d'anticorps de marquage sont préparés.

Le « Mix 1 » permet le marquage du phénotype des lymphocytes en différenciant les LT et LB. Pour réaliser ce marquage, un mélange est réalisé avec les anticorps ci-dessous (fournisseur BioRad Antibodies, USA) avec les quantités suffisantes pour un volume total de 60 µL par tube à marquer :

- Anticorps anti-CD45 couplé à la R-Phycoérythrine (RPE) dilué au 1/20^{ème} de solution PBS+0,5%BSA,
- Anticorps anti-CD3 couplé à la Fluorescéine Isothiocyanate (FITC) dilué au 1/20^{ème} de solution PBS+0,5%BSA,
- Anticorps anti-CD21 couplé à l'Alexa 647 (A647) dilué au 1/50^{ème} de solution PBS+0,5%BSA.

Pour le « Mix 2 », une solution prête à l'emploi (BioRad Antibodies, USA) est utilisée pour identifier les différentes populations de LT : LT CD4 et LT CD8. Ce mélange contient donc des

anticorps anti-CD3 couplé au fluorochrome FITC, des anticorps anti-CD4 couplés au fluorochrome RPE et des anticorps anti-CD8 couplé au fluorochrome A647. Pour 14 des chiens (chiens 17 à 31), le mélange n'était plus disponible. Le marquage a donc été réalisé avec un mélange identique mais préparé à partir de tube contenant chacun un seul type d'anticorps et du même fournisseur (BioRad Antibodies, USA) avec les quantités suffisantes pour un volume total de 60 µL par tube à marquer :

- Anticorps anti-CD3 couplé FITC dilué au 1/20^{ème} de solution PBS+0,5%BSA,
- Anticorps anti-CD4 couplé RPE dilué au 1/20^{ème} de solution PBS+0,5%BSA,
- Anticorps anti-CD8 couplé Alexa 647 dilué au 1/50^{ème} de solution PBS+0,5%BSA.

Enfin, le « Mix 3 » permettait le marquage des différentes cellules myéloïdes et notamment des monocytes. Ce mélange a été réalisé avec les anticorps suivants pour un volume total de 60 µL par tube à marquer :

- Anticorps anti-CD11b couplé PE (Miltenyi Biotec) dilué au 1/50^{ème} de solution PBS+0,5%BSA,
- Anticorps anti-MHCII couplé FITC (BioRad Antibodies) dilué au 1/20^{ème} de solution PBS+0,5%BSA,
- Anticorps anti-CD14 couplé A647 (BioRad Antibodies) dilué au 1/20^{ème} de solution PBS+0,5%BSA.

Le marquage des cellules a lieu avec un ajout de 50 µL de PBS+0,5%BSA dans le tube « Non marqué » permettant de servir de témoin du marquage correct des cellules, un ajout de 50 µL du « Mix 1 » dans le tube correspondant, un ajout de 20 µL (si utilisation du mélange « prêt à l'emploi ») ou 50 µL (si mélange préparé à partir de tubes séparés) du « Mix 2 » dans le tube correspondant et un ajout de 50 µL du « Mix 3 » dans le tube correspondant (voir figure 23). Une incubation de 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière a ensuite lieu. A l'issue de cette incubation, les cellules sont lavées avec 500 µL de PBS+0,5%BSA, centrifugées à 1 200 rpm pendant 5 minutes et le surnageant obtenu est jeté. La même opération est répétée avec 500 µL de PBS. Enfin, 300 µL sont ajoutés et mélangés aux cellules marquées pour permettre l'acquisition par le cytomètre de flux.

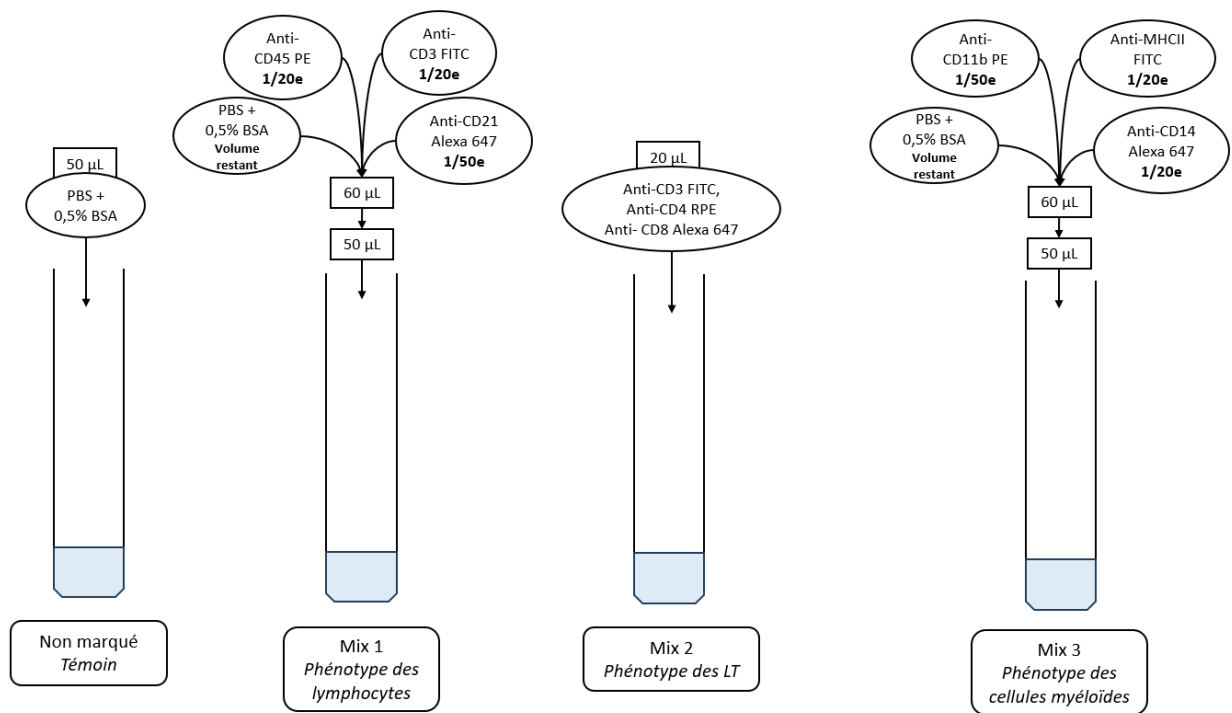
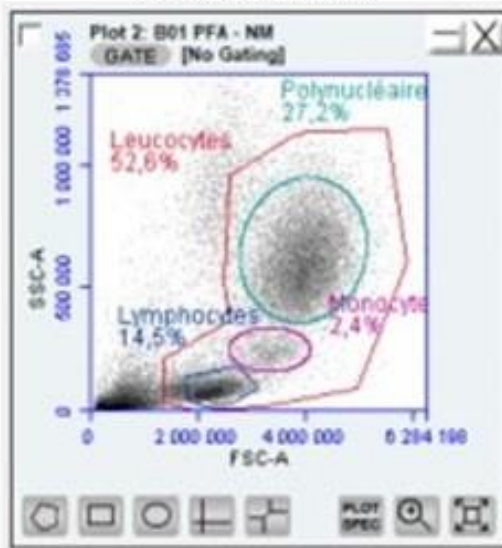


Figure 23 : Marquage des cellules selon les différents mélanges d'anticorps réalisés

C. Lecture des données par le cytomètre de flux

L'automate utilisé pour la cytométrie de flux est un BD Accuri C6 Plus et le logiciel d'acquisition et d'analyses est le BD CSampler Plus (BD Biosciences, USA). Lors du passage des cellules dans le cytomètre, un cytogramme est obtenu pour chaque échantillon. La figure 24 montre l'intérêt de la méthode de *gating* pour l'analyse précise des différentes populations cellulaires. Cette méthode permet d'obtenir des pourcentages précis en éliminant de la zone étudiée les cellules non désirées. Par exemple dans la figure 24, le cytogramme de gauche montre les différentes populations de globules blancs à partir de sang total de chien (avec une lyse partielle des globules rouges réalisées au préalable). Chaque population (lymphocytes, monocytes, polynucléaires) se distingue par des paramètres de tailles et de granulosité différents. La méthode de séparation sur gradient de Ficoll permet d'étudier uniquement les cellules mononucléées (lymphocytes et monocytes) ainsi, le pourcentage de polynucléaires est normalement très diminué mais certains peuvent tout de même être encore présent (de 27,2% des leucocytes sanguins à 2,4%). En fonction des échantillons, la population de monocyte peut également varier faiblement et la population de lymphocytes s'enrichir (ici de 14,5% des leucocytes à 34,5%). Sans *gating*, il est très complexe de pouvoir étudier l'immunophénotype d'une population en particulier.

Populations de GB canins après lyse partielle des GR et fixées en PFA



Populations de PBMCs après gradient de Ficoll et fixées en PFA

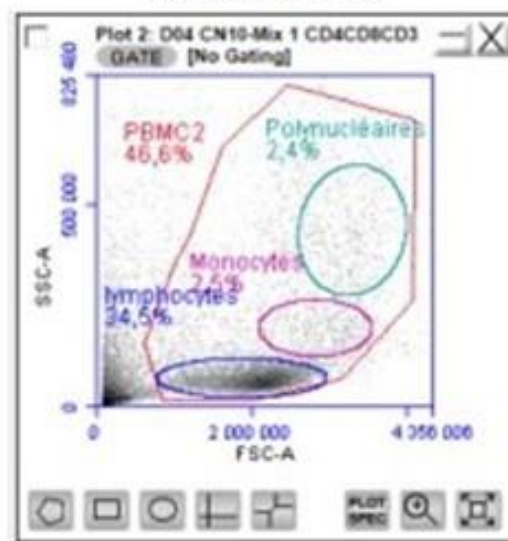


Figure 24 : Répartition des différentes cellules au sein du cytogramme sans gating

GB = Globules blancs = Leucocytes
 GR = Globules rouges = Hématies
 PFA = Paraformaldéhyde

Après avoir effectué le *gating* sur le premier échantillon analysé dans la machine, les échantillons suivants sont analysés en utilisant la même *gate* avec de légères modifications de celle-ci afin de s'adapter au mieux aux populations cellulaires de chaque chien. Cette stratégie de *gating* est explicitée dans la figure 25 en prenant pour exemple le chien numéro 3.

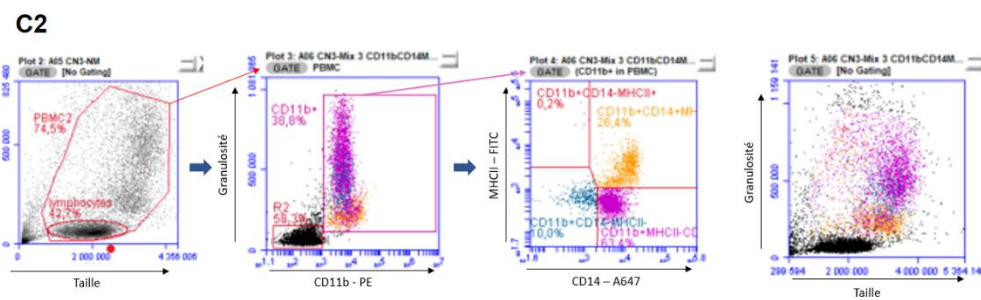
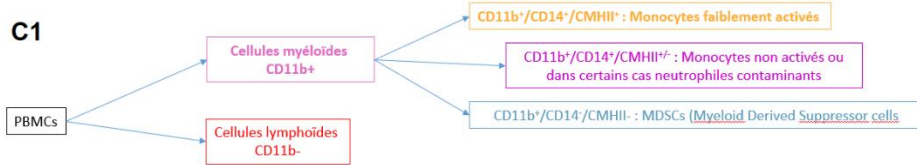
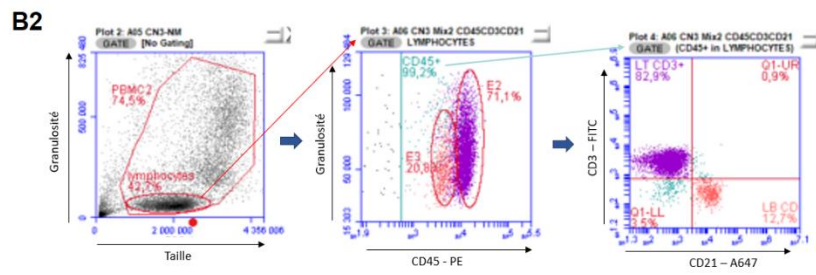
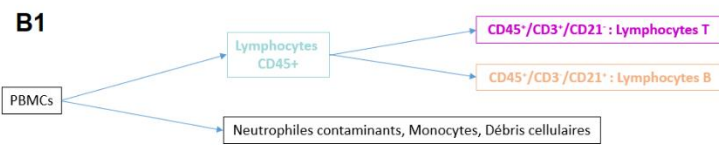
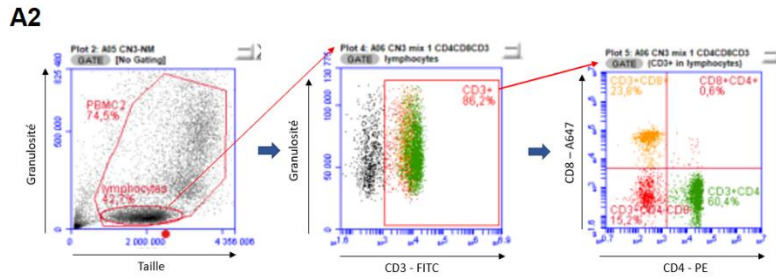
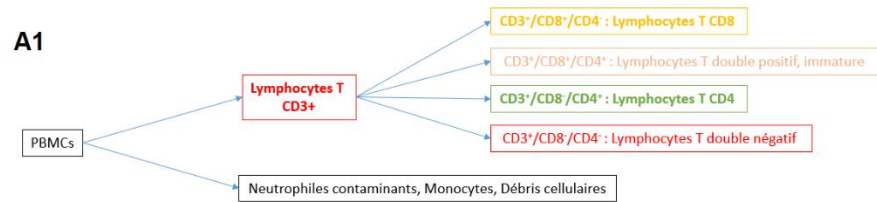


Figure 25 : Stratégies de gating pour chaque marquage, inspiré d'après Colombe, 2020

- A1 : Diagramme explicitant les cellules marquées du « Mix 1 »
- A2 : Cytogrammes et gating pour le « Mix 1 » différenciant les lymphocytes B et T
- B1 : Diagramme explicitant les cellules marquées du « Mix 2 »
- B2 : Cytogrammes et gating pour le « Mix 2 » différenciant les types de lymphocytes T
- C1 : Diagramme explicitant les cellules marquées du « Mix 3 »
- C2 : Cytogrammes et gating pour le « Mix 3 » différenciant les cellules myéloïdes

5. Technique ELISA sandwich pour la mesure de cytokines

Les cytokines IL-6 et TNF α sanguines sont des marqueurs de l'inflammation innée systémique. Au sein de cette étude, leur dosage permet donc de comparer le niveau d'inflammation innée systémique des groupes de chiens exposés ou non au tabagisme passif. Les concentrations plasmatiques de ces deux cytokines IL-6 et TNF α , sont estimées au moyen d'une ELISA sandwich. Cette méthode très sensible et très spécifique, consiste à « emprisonner » entre deux anticorps la molécule étudiée puis à révéler sa fixation par fluorescence d'un substrat (voir figure 26).

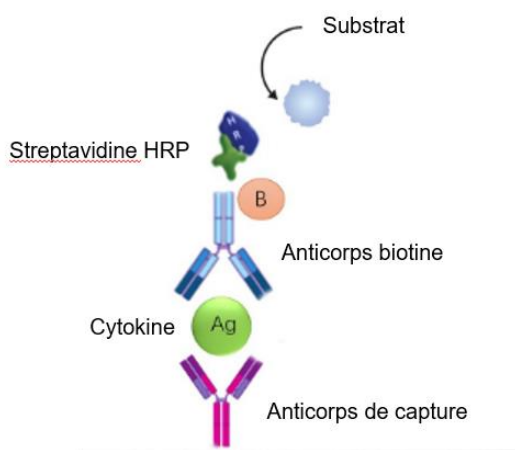


Figure 26 : Principe de la méthode d'ELISA sandwich avec une détection par le complexe streptavidine/biotine. Modifié d'après Creative Biolabs (2023)

Les kits utilisés pour cette étude sont les kits ELISA DuoSet® ELISA DEVELOPMENT SYSTEM Canine IL-6 et Canine TNF- α (respectivement ref. DY1609 et ref. DY1507, Bio-Techne, R&D Systems). Les différents plasmas conservés à -80°C ont été décongelés et le protocole fourni avec les kits a été suivi en effectuant deux mesures pour chaque échantillon (voir figure 27). Les lavages ont été réalisés avec le Wellwash, ThermoScientific, France. Les courbes d'étalonnage ont été effectuées selon le protocole du kit avec des concentrations d'échantillons standard fournis dans le kit, entre 15,6 pg/mL et 1000 pg/mL pour TNF α et entre 62,5 pg/mL et 4000 pg/mL pour IL-6. Les données d'absorbance à 450 nm et 540 nm de chaque puits ont été acquises par le MultiskanGO, ThermoScientific, France. Ces deux mesures permettant de s'affranchir des modifications d'absorbance générées par le plastique de la plaque de 96 puits. Les absorbances obtenues sont soustraites l'une à l'autre ainsi qu'au puit blanc et le traitement des données avec établissement d'une courbe d'étalonnage par régression et détermination des concentrations pour chaque puits a été effectué avec le logiciel GraphPad Prism version 9.3.0. Une moyenne des concentrations de chaque cytokine des deux puits par échantillon est ensuite déterminée *via* le logiciel Excel, Microsoft Inc. La médiane et les quartiles des différentes mesures effectuées pour chaque échantillon sont établis pour la suite du traitement des données.

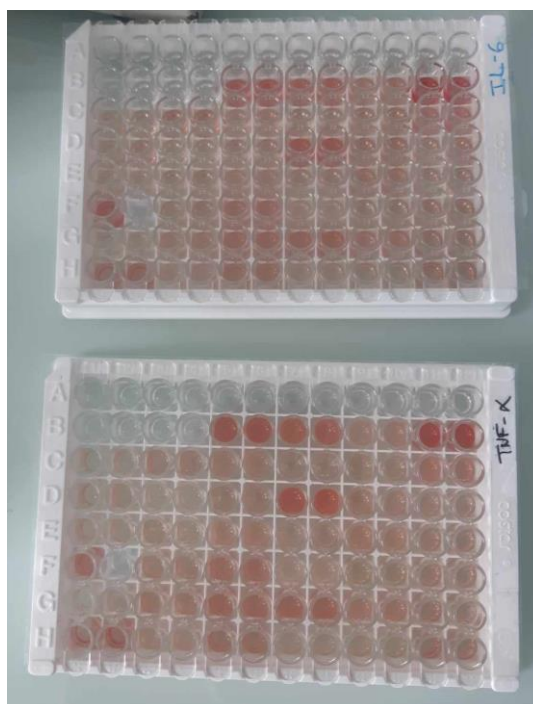


Figure 27 : Plaques 96 puits après dépôts des différents échantillons de plasma en duplicats.

Les puits A1 et A2 forment le témoin négatif.

Les puits A3 à B4 sont destinés à la courbe d'étalonnage, tous effectués en duplicats.

6. Technique ELISA sandwich pour la mesure de la cotinine plasmatique

A. Intérêt du dosage de la cotinine dans cette étude

La cotinine est utilisée en recherche humaine pour quantifier l'exposition à la cigarette en raison de la variabilité qu'entraîne la quantification de l'exposition à la cigarette par un simple questionnaire. Au même titre que la nicotine, la cotinine est un biomarqueur de l'exposition à la cigarette que ce soit par tabagisme direct ou par tabagisme passif chez l'humain. La cotinine est le métabolite principal issu de la dégradation de la nicotine par le foie au sein de l'organisme. On retrouve ce métabolite dans le sang, les urines ou encore la salive. L'intérêt du dosage de la cotinine par rapport à la nicotine directement est lié à la demi-vie d'élimination de la molécule. En effet, la nicotine possède une demi-vie d'environ 2 heures dans le sang contre une demi-vie entre 12 et 20 h pour la cotinine chez l'adulte, 32-82h chez l'enfant et 160h environ pour les nouveau-nés. Ainsi, cette molécule permet d'être un bon biomarqueur de l'exposition au tabac chez l'humain mais uniquement pour une exposition sur du court terme (Jaakkola et Jaakkola, 1997 ; Kim, 2016). Une étude récente a mis en évidence des concentrations de cotinine plus importante dans le sérum et les poils de chiens exposés à la cigarette (Groppetti *et al.*, 2023). Ainsi, afin d'étudier plus précisément l'exposition des chiens inclus dans la cohorte « exposés » de cette étude, la concentration en cotinine plasmatique a été mesurée au moyen d'une ELISA compétitive selon la méthode utilisée dans l'étude de Groppetti *et al.* Cependant, au vu du peu de consensus en médecine humaine sur le fluide corporel idéal à utiliser (plasma, sérum, urine, salive etc...) et avec l'accord de la directrice de cette thèse, l'auteur de ce manuscrit a mesuré la concentration de cotinine sur les plasmas disponibles à la suite de l'étude cytokinique.

B. Protocole ELISA sandwich pour le dosage de la cotinine plasmatique

Le dosage de la cotinine plasmatique est effectué par ELISA sandwich comme pour les cytokines IL-6 et TNF α précédemment dosées. Les échantillons de plasma conservés à -80°C sont décongelés. Le kit ELISA Canine Cotinine (ref. MBS2614389, MyBiosource, USA) est utilisé pour le dosage de la cotinine. Tout comme décrit dans la section précédente, les mesures d'absorbance à 450 nm et 540 nm de la plaque ont été effectuées avec le Wellwash, ThermoScientific, France et les lavages de plaque avec le MultiskanGO, ThermoScientific, France. Les valeurs obtenues sont ensuite soustraites entre elles ainsi qu'à la valeur moyenne des puits blancs. Le traitement des données et la régression ont été effectués par le même logiciel GraphPad Prism. La courbe d'étalonnage est établie avec des concentrations de cotinine des standards du kit, allant de 15,6 à 1 000 ng/mL. Par la suite, les moyennes, médianes, écart-types et quartiles des deux groupes sont établis pour l'analyse statistique des données.

7. Méthodes statistiques d'analyse des données

Pour l'étude statistique des données, les moyennes, médianes, quartiles et écart-types des données ont été établies via le logiciel Excel®, Microsoft Inc. La comparaison des deux cohortes est effectuée en déterminant s'il existe une différence significative entre les médianes de concentrations, de pourcentages ou ratio. Le test statistique utilisé pour comparer ces médianes est un test de la somme des rangs de Wilcoxon, aussi appelé test de Mann-Whitney U. Ce test a été choisi en raison de la non-vérification de l'hypothèse de normalité nécessaire à l'application d'un test de Student pour certaines des données. La normalité des données a été évaluée subjectivement à l'aide d'un graphique (voir figure 28). Ces graphiques ainsi que les tests statistiques ont été établis avec un programme informatique de test statistique codé par l'auteur avec le langage R via l'interface RStudio®. La bibliothèque Rstatix 0.7.2 a été utilisée pour l'application du test de Wilcoxon (R Core Team, 2022). L'hypothèse nulle H0 testée par le test statistique est la suivante : « dans la population de chiens adultes, la médiane du paramètre testé est identique entre la cohorte de chiens exposés et la cohorte de chiens non exposés au tabagisme passif ». Cette hypothèse est rejetée si le degré de signification donné par la p-value p du test est inférieur à 0,05, indiquant alors une différence significative entre les deux cohortes, au risque α de 5%. Les données n'ayant pas une distribution normale sont décrites avec les valeurs statistiques de médianes et des premiers et troisièmes quartiles. Pour les données suivant une loi normale, la moyenne ainsi que la médiane, les quartiles et l'écart-type sont donnés. Le test statistique de Wilcoxon utilisé compare les médianes des données, les moyennes obtenues sont donc données à titre informatif pour comparaison avec la littérature. Ce test nécessite de vérifier comme hypothèse que les deux échantillons à comparer soient indépendants, ce qui est le cas de cette étude. L'implémentation des tests en langage R pour le traitement des données statistiques a été adapté de Kassambara (2018).

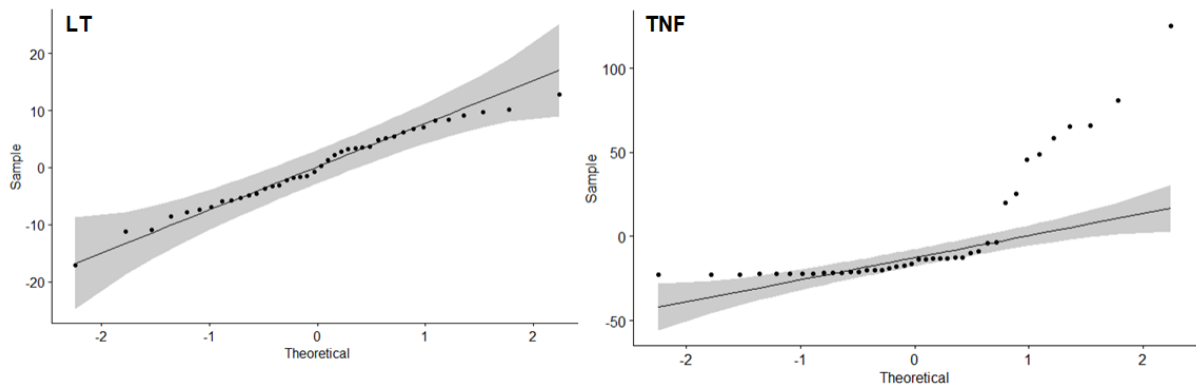


Figure 28 : Représentation graphique de la distribution des données de LT et TNF α autour d'une loi normale.

La zone grise représente la zone de confiance à 95% dans laquelle doivent se situer les données pour vérifier une loi normale. Le graphique LT pour les lymphocytes T montre que les données de pourcentages des LT en cytométrie de flux suivent une loi normale. En revanche, le graphique TNF pour la mesure des concentrations en TNF α plasmatique montre que ces données ne suivent pas une loi normale.

D'après Faldyna *et al*, le sexe du chien peut potentiellement influencer le système immunitaire (Faldyna *et al*, 2001). Afin de s'affranchir d'un potentiel biais de confusion induit par le sexe de l'animal, les tests statistiques effectués ont été réalisés sur l'ensemble des échantillons mais aussi sur les mâles seuls et les femelles seules.

III. Résultats

1. Données statistiques des deux groupes

La cohorte « non exposés » est composée de 29 chiens d'âge moyen 3 ans et poids moyen 24 kg. La cohorte « exposés » est composée de 11 chiens d'âge moyen 3 ans et poids moyen 27 kg. L'exposition des animaux de la cohorte « exposés » est en moyenne de 1,56 cigarettes par jour (cpg) (0,1 à 5 cpg) établie pour 6 animaux sur 11. Les propriétaires de cinq chiens de la cohorte « exposés » ont déclaré une exposition intermittente (week-end, vacances) à la cigarette. Pour ces individus, la quantification exacte de l'exposition au tabagisme passif en cpg n'a donc pas été possible. Le chien numéro 23 de la cohorte « non exposés » a été exclu en raison d'une vaccination trop récente. Pour les deux cohortes, le nombre de mâles est supérieur au nombre de femelles avec entre 57 et 73% de mâles. De plus, les chiens de type bergers (berger allemand, berger australien, berger belge malinois...) représentent dans les deux groupes environ 50% de l'effectif total. Les chiens de type retrievers (labrador, golden retriever ...) représentent la seconde majorité avec entre 17 et 36% de l'effectif (voir tableau 5).

Tableau 5 : Données chiffrées sur les deux cohortes de l'étude

	Non exposés	Exposés
	Moyenne ± écart-type Nombre (% parmi l'effectif total du groupe)	Moyenne ± écart-type Nombre (% parmi l'effectif total du groupe)
Nombre d'individus	29	11
Âge (années)	3 ± 1,8	3 ± 1,5
Âge minimal	1	1
Âge maximal	9	6
Poids (kg)	24 ± 10,2	27 ± 9,8
Poids minimal	3,5	14
Poids maximal	40	41
Sexe		
Mâle castré	14 (50%)	8 (73%)
Mâle entier	2 (7%)	0
Femelle stérilisée	10 (34%)	3 (27%)
Femelle entière	3 (9%)	0
Race		
Bergers	14 (48%)	6 (55%)
Retriever	5 (17%)	4 (36%)
Autres	10 (35%)	1 (9%)
	Beagle (2), Lévrier, Border terrier, Shih tzu, Spitz allemand nain, Boxer, Croisé (2), Bouvier d'appenzell	Cocker

2. Résultats de NFS

Les concentrations en neutrophiles, éosinophiles, monocytes et lymphocytes n'ont pas pu être déterminées par l'automate pour deux chiens mâles de la cohorte « exposés » en raison d'un problème technique. Les moyennes pour les chiens « exposés » ont donc été établie sur 9 chiens. Les données brutes rendues par l'automate se trouvent en annexe 5. Le tableau 6 donne les moyennes et écarts types de chaque élément mesuré par l'automate pour le groupe « exposés » et « non exposés ». De plus, le ratio neutrophiles/lymphocytes a été calculé pour chacun des individus des deux échantillons. Les données des neutrophiles, éosinophiles et basophiles ne suivaient pas une loi normale, ainsi le tableau 6 donne la valeur de la médiane et des quartiles au lieu de la moyenne et de l'écart-type (SD).

Tableau 6 : Données statistiques des cellules sanguines mesurées lors de la NFS

		GR	GB	Neutrophiles	Eosinophiles	Basophiles	Monocytes	Lymphocytes	Plaquettes	Ratio Neutrophile/Lymphocyte
		(10 ⁶ /μL)	(10 ³ /μL)	(10 ³ /μL)	(10 ³ /μL)	(10 ³ /μL)	(10 ³ /μL)	(10 ³ /μL)	(10 ³ /μL)	
Exposés	Moyenne ± SD	7,06 ± 0,54	9,28 ± 3,6				0,57 ± 0,16	2,71 ± 0,6	192 ± 113	1,95 ± 1,04
	Médiane	7,06	7,79	4,31	0,53	0,02	0,57	2,61	195	1,54
	1 ^{er} – 3 ^{ème} quartile	6,99 – 7,31	7,22 – 11,68	3,81 – 5,25	0,51 – 0,60	0,01 – 0,04	0,43- 0,60	2,47 – 2,90	85 - 302	1,26 – 2,32
Non exposés	Moyenne	7,32 ± 0,68	9,27 ± 2,32				0,5 ± 0,18	2,8 ± 0,9	212 ± 92	2 ± 0,75
	Médiane	7,39	9,09	4,82	0,52	0,02	0,49	2,77	190	1,75
	1 ^{er} – 3 ^{ème} quartile	6,78 – 7,70	7,66 – 10,99	3,93 – 6,15	0,35 – 0,61	0,01 – 0,03	0,34 – 0,63	2,02 – 3,34	158 - 257	1,47 – 2,46
P-value		0,39	0,74	0,48	0,54	0,47	0,33	0,92	0,81	0,46

GR = Globules rouges = Hématies, GB = Globules blancs = Leucocytes, SD = *Standard deviation* = Ecart-type

Aucune différence significative n'est observable avec un degré de signification p du test supérieur à 0,05 sur les valeurs de concentrations des cellules immunitaires entre les chiens exposés et non exposés. De plus, aucune différence sur le ratio neutrophile/lymphocyte n'est notée entre les deux populations. Les données ont aussi été comparés en prenant en compte le sexe de l'animal, aucune différence significative n'a été mise en évidence (voir annexe 9).

3. Résultats de cytométrie de flux

Afin de pouvoir comparer les pourcentages des différentes populations de cellules mononuclées retrouvées dans le sang des chiens non exposés et exposés, un cytogramme est établi pour chaque marquage et chaque chien. Pour chaque échantillon, les pourcentages des cellules citées ci-après ont été notés : CD3+ CD21- (LT) et de CD3- CD21+ (LB) pour le Mix 1, CD4+ CD8- (LTCD4), CD4+ CD8+ (LT double positif), CD4- CD8+ (LTCD8) et CD4- CD8- (LT double négatif) pour le Mix2, CD14- CMHII+ (LB contaminants), CD14+ CMHII+ (Monocytes matures), CD14+ CMHII- (Monocytes immatures, ou dans certains cas neutrophiles contaminants) et CD14- CMHII- (Cellules myéloïdes suppressives (MDSC)) pour le Mix 3. Ces pourcentages ont été établis grâce à la stratégie de gating expliquée auparavant pour chaque marquage (voir figure 29).

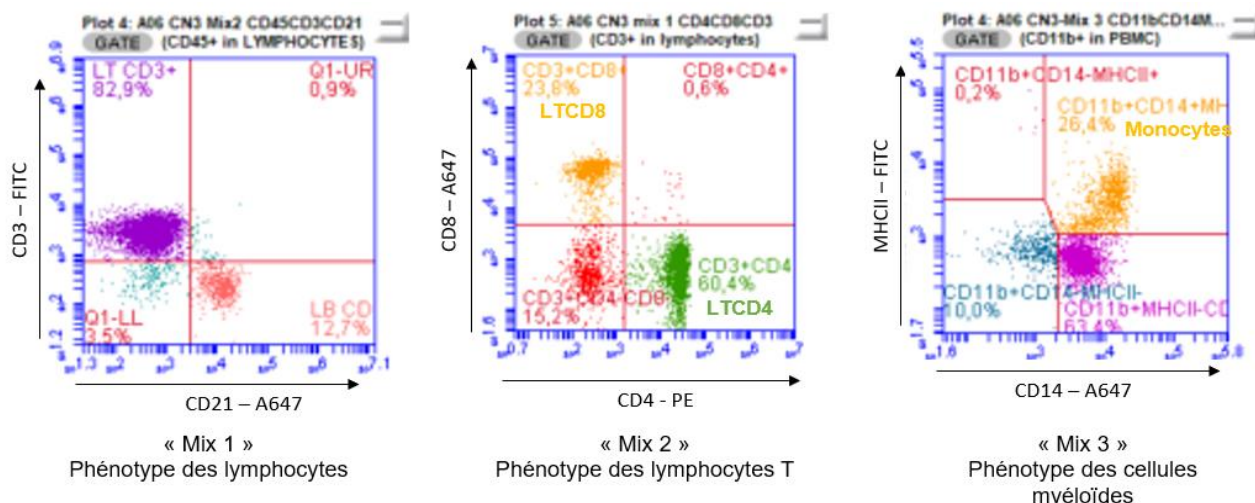


Figure 29 : Cytogrammes permettant la lecture des différents pourcentages cellulaires pour chaque marquage, exemple du chien 3.

Le tableau 7 fournit les données statistiques des différents marquages. Les données ne suivant pas une loi normale sont les MDSCs, les monocytes immatures et MDSCs des femelles et les LB des mâles. Les écarts types des mesures du « Mix 3 » sont plus importants que ceux des « Mix 1 » et « Mix 2 ».

Tableau 7 : Données statistiques des différents marquages en cytométrie de flux

		« Mix 1 »		« Mix 2 » : Phénotype des LT						« Mix 3 » Cellules myéloïdes			
		Phénotype des lymphocytes		LTCD4	LTCD4+	LTCD8	LTCD4-	Ratio	LB	Monocytes	Monocytes	MDSC	
		LT (%) parmi CD45)	LB (%) parmi CD45)	(% parmi CD3)	CD8+ (% parmi CD3)	(% parmi CD3)	CD8- (% parmi CD3)	CD4/CD8	contaminants MHCII+ CD14- (% parmi CD11b)	MHCII+ CD14+ (% parmi CD11b)	immatures ou Neutrophiles contaminants MHCII-CD14+ (% parmi CD11b)	MHCII-CD14- (% parmi CD11b)	
Exposés	Moyenne ± SD	75,3 ± 7	17,6 ± 5,9	55,8 ± 7,9	0,9 ± 0,4	25,3 ± 7,3	18 ± 5,1	2,37 ± 0,83	14,4 ± 15,3	52 ± 15,8	27,5 ± 21,7		
	Médiane	76,6	16,7	54,2	0,9	24,5	17,2	2,42	8,9	46,3	20,4	5,8	
	1 ^{er} – 3 ^{ème} quartile	70 – 80	13,3 – 19,1	51,7 – 61	0,7 – 1,2	20,7 – 26,8	15,4 – 21	1,99 – 2,58	2,2 – 23,8	44,8 – 68,1	7,15 – 43,9	2,3 – 7,7	
Non exposés	Moyenne ± SD	74,8 ± 7	16,2 ± 6,1	53,4 ± 8,2	0,8 ± 0,3	27,6 ± 7,4	18,2 ± 4,7	2,15 ± 0,81	13,8 ± 10,5	70,3 ± 13,7	9 ± 9,4		
	Médiane	74,1	16,2	54	0,8	26,6	18,2	2,14	11,4	73,4	5	1,2	
	1 ^{er} – 3 ^{ème} quartile	70 – 80,3	13,1 – 19,5	49 – 59,3	0,6 – 1	22,8 – 30,5	14,6 – 20,2	1,44 – 2,72	6 – 21	58,9 – 83	3,1 – 10,7	0,5 – 7,8	
P-value		0,99	0,66	0,72	0,3	0,31	0,99	0,46	0,6	0,0088	0,0046	0,33	
Exposés Mâles	Moyenne ± SD	76,3 ± 5,3		54,6 ± 4	1,1 ± 0,4	24,4 ± 4,1	19,9 ± 4,7	2,3 ± 0,72	14,7 ± 13,7	58,4 ± 17,4	22,1 ± 21,4	4,8 ± 3,4	
	Médiane	76,6	15,9	53,6	1	25,1	19,4	2,27	11,8	53,8	8,6	4,6	
	1 ^{er} – 3 ^{ème} quartile	73 – 79,9	13,5 – 18,1	51,2 – 56	0,9 – 1,4	20,7 – 26,3	17,8 – 22,6	2,03 – 2,48	4 – 19,8	44,8 – 76,1	6,7 – 41,7	2,9 – 6,4	
Non exposés Mâles	Moyenne ± SD	73,2 ± 7,9		53 ± 8,7	0,8 ± 0,2	27 ± 7	19,3 ± 5,4	2,15 ± 0,83	13,1 ± 11,1	68,2 ± 14,6	9,8 ± 8,7	8,9 ± 12,8	
	Médiane	72,8	16,7	53,6	0,8	26,4	18,9	2,14	9,9	68,3	7,2	1,1	
	1 ^{er} – 3 ^{ème} quartile	68,4 – 77,9	15,4 – 19,8	49 – 59,2	0,7 – 0,9	22,5 – 30,3	15,9 – 23,2	1,43 – 2,60	5,2 – 21,4	55,3 – 83,4	3,2 – 16,6	0,5 – 18,5	
P-value Mâles		0,33	0,46	0,98	0,042	0,36	0,6	0,53	0,9	0,13	0,16	0,6	
Exposés Femelles	Moyenne ± SD	71,7 ± 10,2	22,4 ± 8,5	57,6 ± 15	0,7 ± 0,3	27,6 ± 13	14 ± 2,4	2,57 ± 1,61	12,3 ± 19,8	44,8 ± 15,6			
	Médiane	68	26,3	60,7	0,6	23,9	14,8	2,54	1,6	45,3	21,4	8,5	
	1 ^{er} – 3 ^{ème} quartile	65,9 – 75,6	19,5 – 27,3	51 – 65,8	0,6 – 0,8	20,4 – 33	13,1 – 15,4	1,76 – 3,36	0,9 – 18,4	37,2 – 52,7	20,4 – 41,9	4,4 – 12,7	
Non exposés Femelles	Moyenne ± SD	76,8 ± 5,4	14,4 ± 5,1	53,8 ± 7,8	0,9 ± 0,4	28,5 ± 8,1	16,8 ± 3,3	2,1 ± 0,82	14,6 ± 10	72,9 ± 12,8			
	Médiane	78,3	13,7	54	1	26,6	17,8	2,08	13,9	75,6	4,9	1,7	
	1 ^{er} – 3 ^{ème} quartile	71,6 – 81	12 – 18,7	51 – 59,3	0,5 – 1,3	22,8 – 33,7	13,9 – 19,1	1,57 – 2,83	6,5 – 18,5	66,4 – 78,8	3,1 – 5,3	0,5 – 5,8	
P-value Femelles		0,3	0,18	0,44	0,54	0,8	0,5	0,7	0,44	0,022	0,014	0,5	

SD = Standard deviation = Ecart-type

Le test de la somme des rangs de Wilcoxon est significatif pour les moyennes des pourcentages de monocytes parmi les cellules CD11b+ évalués par cytométrie de flux sur l'ensemble des échantillons et sur les femelles (voir figure 30). Dans l'échantillon, la médiane du pourcentage de monocytes matures parmi les cellules CD11b+ parmi les chiens du groupe

« exposés » (médiane = 46,3%) était significativement inférieure à la médiane parmi les chiens « non exposés » (médiane = 73,4% ; $p < 0,01$). Dans l'échantillon n'incluant que les femelles, la médiane du pourcentage de monocytes matures parmi les cellules CD11b+ parmi les femelles du groupe « exposés » (médiane = 45,3%) était significativement inférieure à la médiane parmi les femelles « non exposés » (médiane = 75,6% ; $p = 0,02$).

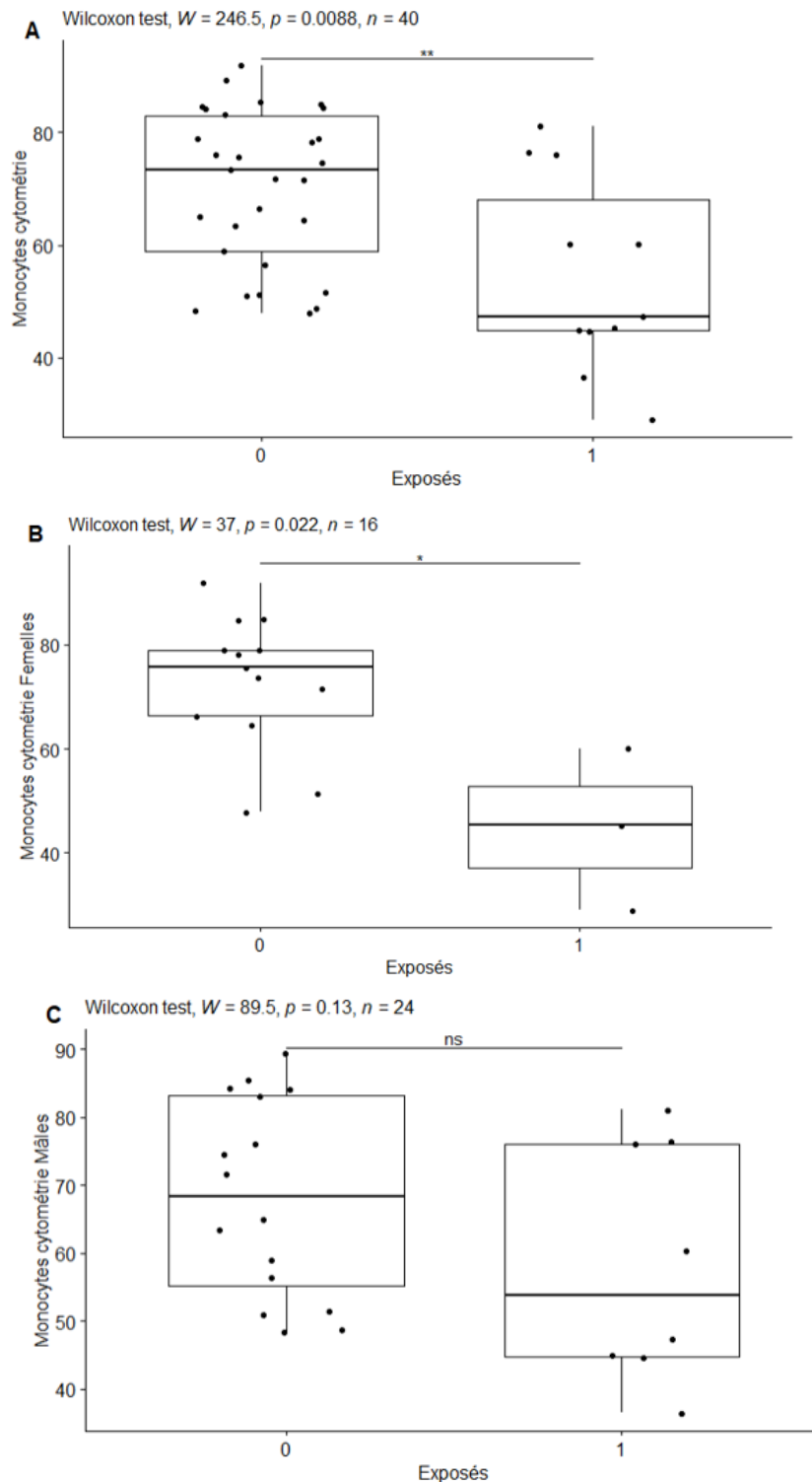


Figure 30 : Diagramme en boîtes des valeurs de monocytes établies par cytométrie de flux chez les chiens « non exposés » (noté 0) et les chiens « exposés » (noté 1) avec en A les % sur l'échantillon global, en B les % sur les femelles et en C les % sur les mâles.

Les extrémités horizontales des boîtes indiquent le premier et le troisième quartile, la barre horizontale centrale indique la médiane, les extrémités des barres verticales indiquent les premiers et neuvièmes déciles, les points représentent les valeurs de chaque mesure.

W est la valeur de la somme des rangs de Wilcoxon, p la p -value,

n est l'effectif de l'échantillon étudié, ns : non significatif,

* : différence significative légère,

** : différence significative modérée

Une différence significative est mise en évidence pour les monocytes immatures (CD11b+ MHCII-CD14+) dans les échantillons et chez les femelles (voir figure 31). Dans l'échantillon, la médiane du pourcentage de monocytes immatures parmi les cellules CD11b+ parmi les chiens du groupe « exposés » (médiane = 20,4%) était significativement supérieure à la médiane parmi les chiens « non exposés » (médiane = 5% ; $p < 0,01$). Dans l'échantillon n'incluant que les femelles, la médiane du pourcentage de monocytes immatures parmi les cellules CD11b+ parmi les femelles du groupe « exposés » (médiane = 21,4%) était significativement supérieure à la médiane parmi les femelles « non exposés » (médiane = 4,9% ; $p = 0,01$). Les résultats obtenus dans l'échantillon sont donc inverse entre les monocytes matures (CD11b+ MHCII+ CD14+) et immatures (CD11b+ MHCII-CD14+). La différence est non significative chez les mâles en revanche dans les deux catégories : monocytes matures et immatures.

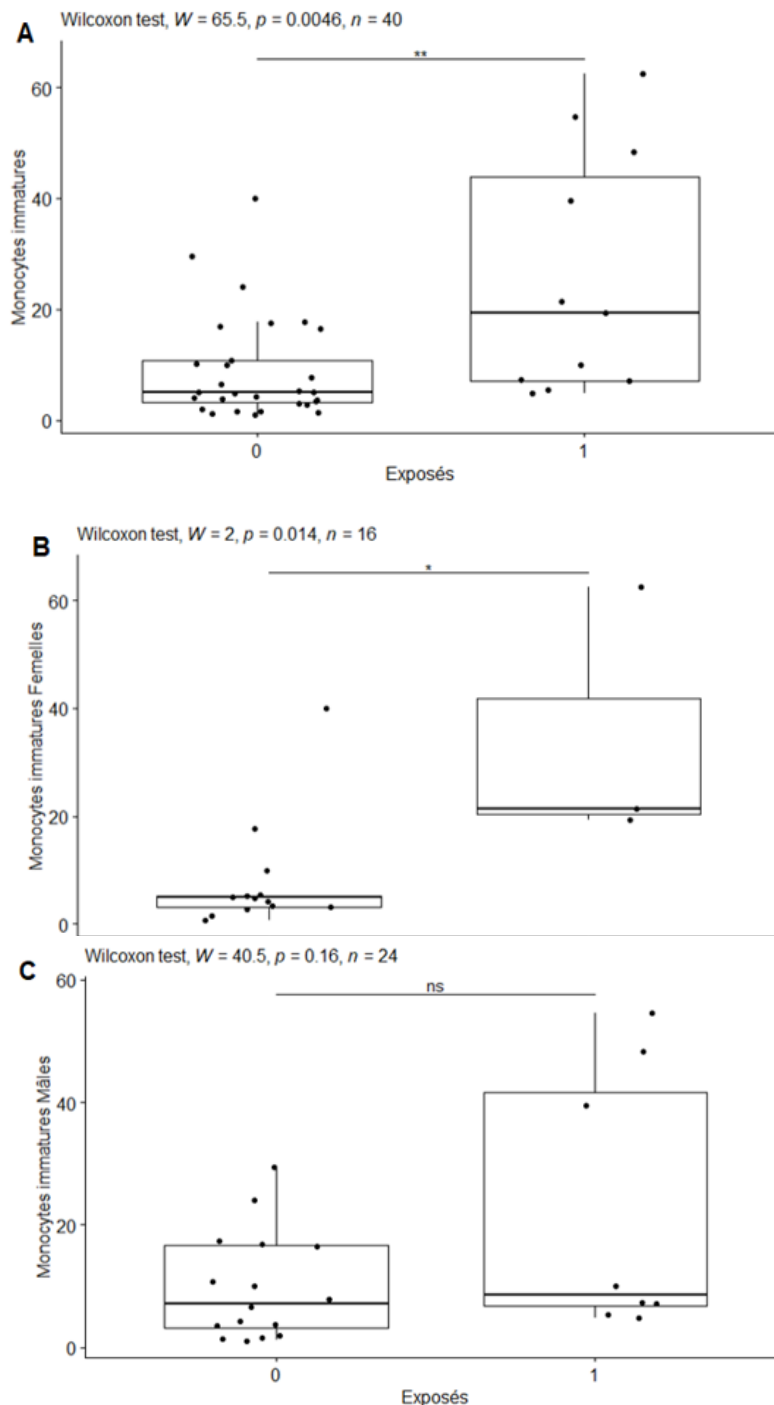


Figure 31 : Diagramme en boîtes des valeurs de monocytes immatures (CD11b+ MHCII-CD14+) établies par cytométrie de flux chez les chiens « non exposés » (noté 0) et les chiens « exposés » (noté 1) avec en A les % sur l'échantillon global, en B les % sur les femelles et en C les % sur les mâles.

Les extrémités horizontales des boîtes indiquent le premier et le troisième quartile, la barre horizontale centrale indique la médiane, les extrémités des barres verticales indiquent les premiers et neuvièmes déciles, les points représentent les valeurs de chaque mesure.

W est la valeur de la somme des rangs de Wilcoxon,

p la p-value,

n est l'effectif de l'échantillon étudié,

ns : non significatif,

* : différence significative légère,

** : différence significative modérée

Sur la population lymphocytaire, les résultats ne montrent pas de différence majeure. En effet, aucune différence significative n'est observée sur les proportions de LB et LT circulants entre les chiens exposés et les chiens non exposés. De plus, aucune différence n'est notable sur les phénotypes CD4 et CD8 des LT entre les deux groupes comparés. Le ratio CD4/CD8 s'avère être inférieur chez les chiens non exposés ($2,15 \pm 0,81$) par rapport aux chiens exposés ($2,37 \pm 0,83$), sans différence significative cependant. Enfin, la population en lymphocytes T CD4+ CD8+ dits double positif (DP) montre une différence significative chez les chiens mâles de l'échantillon (voir figure 32). Dans l'échantillon n'incluant que les mâles, la médiane du pourcentage de lymphocytes double positif parmi les cellules CD3+ parmi les mâles du groupe « exposés » (médiane = 1%) était significativement supérieure à la médiane parmi les mâles « non exposés » (médiane = 0,8% ; $p = 0,04$)

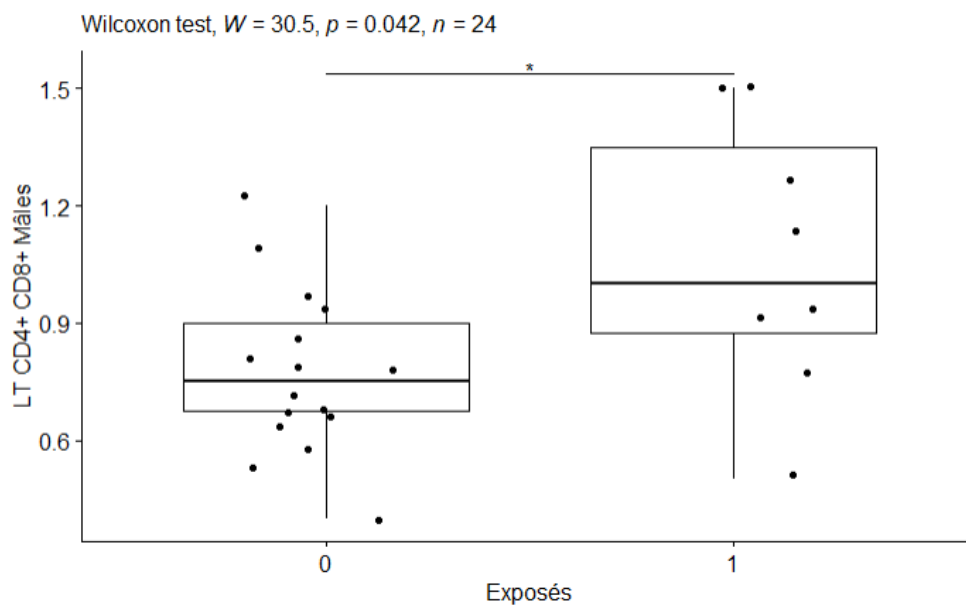


Figure 32 : Diagramme en boîtes des valeurs de LT CD4+ CD8+ double positif établis par cytométrie de flux chez les chiens mâles « non exposés » (noté 0) et les chiens mâles « exposés » (noté 1).

Les extrémités horizontales des boîtes indiquent le premier et le troisième quartile, la barre horizontale centrale indique la médiane, les extrémités des barres verticales indiquent les premiers et neuvièmes déciles, les points représentent les valeurs de chaque mesure.

W est la valeur de la somme des rangs de Wilcoxon, p la p -value, n est l'effectif de l'échantillon étudié, ns : non significatif, * : différence significative légère, ** : différence significative modérée

4. Résultats des ELISA des cytokines IL-6 et TNF α

Pour chaque série de résultats, une courbe de régression polynomiale quadratique est établie avec les valeurs de la courbe d'étalonnage permettant la détermination des différentes concentrations plasmatiques des cytokines (voir figure 33).

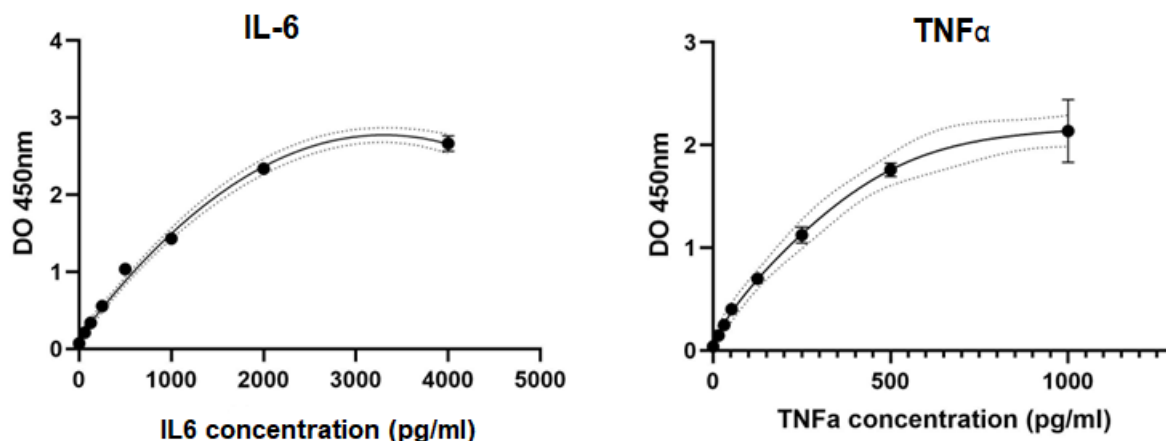


Figure 33 : Courbes de régression obtenues par étalonnage sur le logiciel GraphPad PRISM pour le deuxième essai d'IL-6 à gauche et pour TNF α à droite.

Axe des ordonnées : Densité optique à 450 nm, Axe des abscisses : Concentration de la cytokine en pg/mL, DO = Densité optique

En raison d'une dilution erronée d'un facteur 10 pour le premier essai de mesure d'IL-6, la concentration de certains échantillons n'a pas pu être calculé (densité optique sous le seuil de détection du kit). Les valeurs de la courbe d'étalonnage se situent entre 6,25 et 400 pg/mL. Le protocole a donc été renouvelé en excluant les échantillons dont les concentrations étaient inférieures à 6,25 pg/mL. Pour les échantillons 2, 13, 14, 25, 28, 31, 33, 37, 39 dont les concentrations mesurées étaient trop importantes (sortie de la courbe de régression), une dilution a été effectuée au 1/5^{ème} et 1/10^{ème}. Une moyenne des concentrations obtenues au premier et deuxième ELISA pour la cytokine IL-6 a été effectuée pour chaque échantillon. Les données ainsi obtenues pour IL-6 ainsi que pour TNF α ne suivant pas une loi normale, la médiane et les quartiles sont déterminés (voir tableau 8).

Tableau 8 : Données statistiques des mesures de cytokines IL-6 et TNF α

		IL-6 (pg/mL)	TNF α (pg/mL)
Exposés	Médiane	135,8	1,6
	Premier quartile	52,7	1
	Troisième quartile	233,7	7,5
Non exposés	Médiane	28,5	3
	Premier quartile	6,3	1
	Troisième quartile	455,9	19,8
P-value		0,69	0,65

Aucune différence significative n'est mise en évidence ($p > 0,05$) entre les deux échantillons pour les deux cytokines plasmatiques étudiées. Cependant, les médianes des concentrations d'IL-6 entre le groupe « exposés » et le groupe « non exposés » montrent une différence d'un facteur 16 fois supérieur pour le groupe « exposés ». Les données ont aussi été comparées en fonction du sexe mais aucune différence significative n'a été mise en évidence (voir annexe 9).

5. Résultats de l'ELISA cotinine

En raison de la faible quantité restante de plasma congelé, une dilution de certains plasmas a été nécessaire. Certaines valeurs mesurées dépassaient les concentrations utilisées pour la courbe d'étalonnage entre 15,6 et 1000 ng/mL. En raison de l'impossibilité de réaliser de nouveau l'expérience, les chiens dépassant ces valeurs ont été attribués à la valeur $< 15,6$ ng/mL ou > 1000 ng/mL. Les chiens 5, 6, 12 à 17, 20, 28, 31, 32, 36 et 40 ont été concernés par cette approximation. Les analyses statistiques ont été réalisés avec les valeurs 15,6 ng/mL et 1000 ng/mL pour ces chiens. La figure 34 montre la courbe de régression polynomiale quadratique établie par le logiciel GraphPadPrism. Cette courbe a permis d'établir les concentrations plasmatiques de cotinine chez les chiens exposés et non exposés.

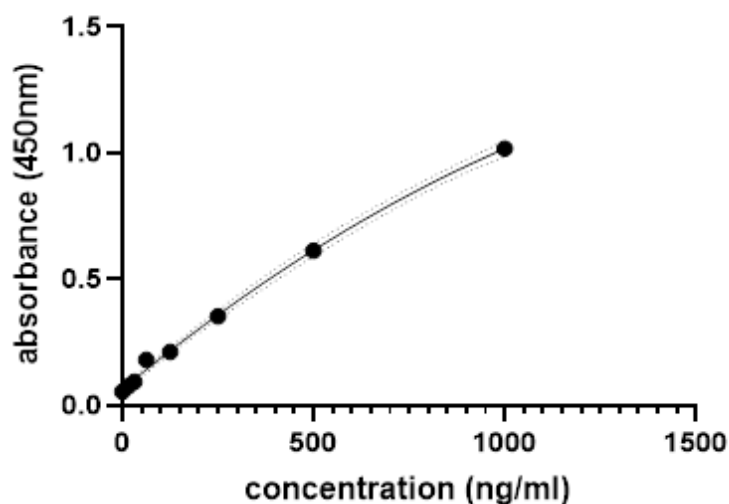


Figure 34 : Courbe d'étalonnage par régression polynomiale quadratique pour la cotinine plasmatique

Le tableau 9 donne les données statistiques établie sur les concentrations déterminées par le logiciel avec la courbe de régression. Les données obtenues suivant une loi normale, les moyennes et écart-types ont pu être établis. La médiane et les premiers et troisièmes quartiles sont aussi donnés.

Tableau 9 : Données statistiques des mesures de cotinine plasmatique

		Cotinine (ng/mL)
Exposés	Moyenne	651,5 ± 379,4
	Médiane	738,5
	1 ^{er} – 3 ^{ème} Quartile	367,8 – 1000
Non exposés	Moyenne	531,6 ± 428,9
	Médiane	301,6
	1 ^{er} – 3 ^{ème} Quartile	186,6 – 1000
P-value		0,43

Aucune différence significative n'est mise en évidence entre le groupe « exposés » et « non exposés » avec $p = 0,43 > 0,05$. Il est cependant remarqué que les valeurs du groupe « exposés » sont supérieures à celles du groupe « non exposés ». Les écart-types des deux groupes sont, par ailleurs, très importants. Une grande variabilité des données au sein des groupes est ainsi présente.

IV. Discussion

Cette étude avait pour but de comparer les différents paramètres systémiques sanguins du système immunitaire (numération formule sanguine, cytokines plasmatiques et populations cellulaires des lymphocytes et monocytes sanguins) de chiens exposés et non exposés au tabagisme passif. Aucune différence majeure entre les deux groupes étudiés n'a été mise en évidence pour les mesures de NFS, de cytokines IL-6 et TNF α ou pour la population lymphocytaire évaluée en cytométrie de flux. Pour la population monocyttaire, il a été établi une différence statistique sur les pourcentages de monocytes matures et immatures entre le groupe « exposés » et « non exposés » au tabagisme passif. De plus, des différences de résultats ont été montrées selon le sexe des chiens étudiés. Les femelles présentaient une différence statistique sur le pourcentage de monocytes matures et immatures en cytométrie de flux que les mâles ne présentaient pas. Chez les mâles, une différence statistique est établie sur le pourcentage de LT DP en cytométrie de flux. Cette différence n'est pas retrouvée chez les femelles.

1. Discussion sur les résultats de NFS

Les résultats obtenus par la NFS ne montrent aucune différence significative entre les deux groupes. Cela fait écho à l'étude citée précédemment de Kolanjian *et al* sur des chats qui n'a pas mis en évidence de modification de la NFS après une exposition contrôlée à la fumée de cigarette (Kolahian *et al.*, 2014). Cependant, leur étude a été réalisée sur un faible effectif (5 chats dans chaque groupe) et ne peut donc pas être considérée avec un effectif suffisant pour montrer un résultat statistiquement interprétable.

D'après la littérature, les valeurs de NFS obtenues pour les deux groupes de chiens sont dans les valeurs usuelles de l'espèce canine pour des individus adultes et sains (voir tableau 10). Bien que les valeurs varient selon les automates utilisés, les intervalles de confiance établis restent similaires (Bourgès-Abella *et al.*, 2015 ; Cornell University College of Veterinary Medicine, 2019 ; UC Davis VMTH, 2011).

Il est aussi établi que la NFS peut subir de nombreuses modifications chez le chien notamment selon l'âge, le sexe, l'état de jeûne de l'animal, la durée de la prise de sang, la présence d'une anesthésie, le régime alimentaire et le mode de logement de l'animal ainsi que selon la manipulation plus ou moins stressante des animaux et la manipulation des échantillons sanguins (Weiss et Wardrop, 2010). Lors de notre stratification sur le sexe, aucune différence n'a été mise en évidence sur les populations des cellules du sang mesurées entre les chiens exposés et non exposés. Les paramètres ayant pu engendrer des variations au sein des individus inclus dans l'étude sont le régime alimentaire et l'état de jeûne. La race du chien peut aussi jouer un rôle dans ses résultats de NFS. D'après Faldyna *et al.*, les chiens de race Berger Allemand possèdent plus de lymphocytes comparés aux chiens de races Beagle, Teckels ou Dalmatien (Faldyna *et al.*, 2001). Il est possible que le ratio neutrophiles/lymphocytes établi dans notre étude soit biaisé par la race des chiens en raison d'une majorité de chiens de type berger inclus dans l'étude.

Tableau 10 : Comparaison des valeurs médianes de chaque paramètre de la NFS obtenues sur les deux groupes de l'étude avec les valeurs de référence établies dans l'étude de Bourgès-Abella *et al.* (2015)

Cellules mesurées	Médianes établies sur le groupe « exposés »	Médianes établies sur le groupes « Non exposés »	Valeurs de référence d'après l'étude de Bourgès-Abella <i>et al.</i> (2015)
Hématies (x10⁶/μL)	7,06	7,39	5,7 – 9,0
Leucocytes (x10³/μL)	7,79	9,09	4,9 – 18,7
Neutrophiles (x10³/μL)	4,31	4,82	2,2 – 12,2
Eosinophiles (x10³/μL)	0,53	0,52	0,1 – 1,5
Basophiles (x10³/μL)	0,02	0,02	ND
Monocytes (x10³/μL)	0,57	0,49	0,1 – 1,5
Lymphocytes (x10³/μL)	2,61	2,77	1,2 – 4,5
Plaquettes (x10³/μL)	195	190	183 – 576
Ratio neutrophile/lymphocyte	1,95 ± 1,04*	2 ± 0,75*	1,7 ± 0,9 ^a

* : Moyenne ± Ecart-type

^a : d'après le groupe de Beagle d'âge entre 3 et 5 ans de Faldyna *et al.*, 2001

2. Discussion sur les résultats de cytométrie de flux

Plusieurs résultats obtenus par cytométrie de flux se sont montrés significatifs. Les monocytes immatures étaient augmentés en nombre dans le groupe « exposés », les monocytes matures diminués. Les différences obtenues étaient fortement significatives avec des p-value inférieures à 0,01. Un effet du sexe de l'animal est par ailleurs mis en évidence avec les résultats sur les monocytes qui apparaissent non significatifs pour les mâles alors qu'ils le sont chez les femelles. De plus, les pourcentages de LT DP sont significativement différents chez les mâles avec plus de LT DP chez les mâles exposés. Afin d'élargir ces résultats à la population de chiens domestiques, l'antériorité de l'exposition au tabagisme passif par rapport aux modifications biologiques observées doit être garantie. Cependant, de par la construction de notre étude, observationnelle transversale, l'antériorité n'est pas garantie. La présence de biais est aussi possible. Un biais d'échantillonnage est probable en raison du fait que les chiens inclus dans l'étude ne provenaient que d'étudiants vétérinaires ou du personnel de l'EnvA. Cela peut avoir engendré une sélection sur une exposition plus maîtrisée à la cigarette par la connaissance médicale des propriétaires de l'impact de celle-ci sur l'organisme. Un biais de classement est aussi possible en raison de l'exposition au tabagisme passif (faible ou intermittente) de certains chiens, uniquement quantifiée par les propriétaires lors de l'inclusion dans l'étude. Ainsi, certains chiens classés dans la cohorte « exposés » peuvent être en réalité non exposés et inversement. Ce biais de classement est non différentiel du fait de la non-dépendance entre l'erreur de classement et les altérations du système immunitaire du chien concerné. Cependant, pour les données présentant une différence significative, ce biais de classement non différentiel n'entraîne pas la remise en cause de la significativité. En revanche, certaines comparaisons de données n'étant pas significatives aurait pu l'être si ce biais n'avait pas été présent.

Des écart-types et quartiles plus importants sont observés pour les mesures effectuées sur le « Mix 3 » par rapport au « Mix 1 » et « Mix 2 ». Cela est imputable à des variations dans les prises de mesures des pourcentages. En effet, le marquage « Mix 3 » des cellules myéloïdes a présenté pour plusieurs chiens (1, 9, 10, 15, 22, 30, 32) des artefacts pouvant engendrer des erreurs dans les pourcentages établis. Ces artefacts apparaissent sous la forme d'un nuage de points (donc de cellules) formant un trait en diagonale par-dessus le cytogramme habituel (voir figure 35). L'origine exacte de ces artefacts n'a pas été déterminée. Il est possible que cela soit lié à une contamination de certains anneaux de PBMCs par des neutrophiles, cellules pouvant être faiblement marquées par le marqueur CD14 et pouvant être présentes dans l'anneau de PBMCs (cf figure 24). Il est également possible que cet artefact soit dû aux spectres d'émission des fluorochromes qui se chevauchent, bien que les compensations électroniques soient réalisées de façon systématique et automatiques par le cytomètre, permettant d'éviter ces chevauchements.

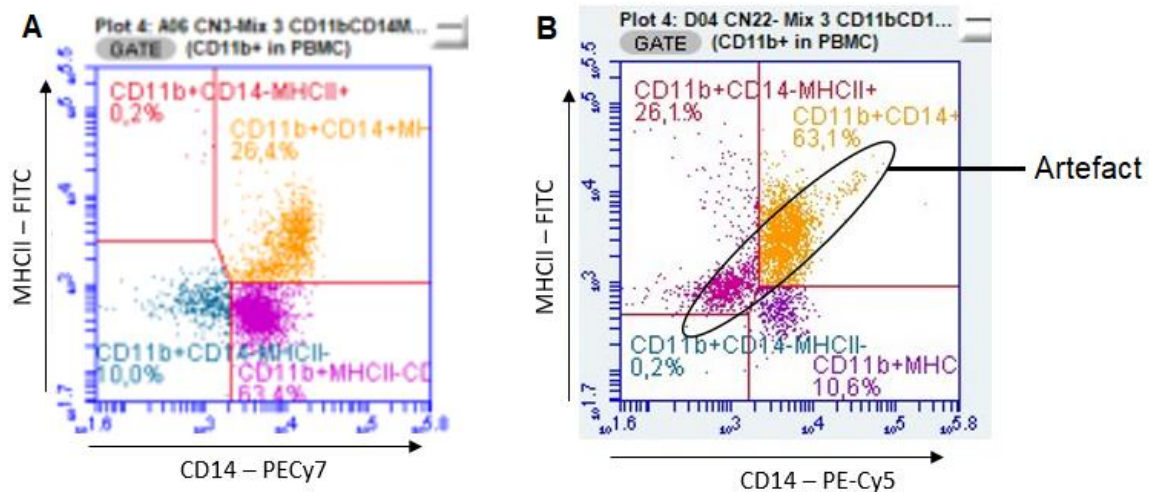


Figure 35 : Comparaison entre un marquage « Mix 3 » ne présentant pas d'artefact (A) et présentant un artefact (B) nuisant à la mesure du pourcentage de monocytes matures parmi les cellules CD11b+

Aucune modification significative du ratio CD4/CD8 n'a été mise en évidence dans cette étude. Ce ratio était cependant supérieur pour les chiens exposés à la cigarette ($2,37 \pm 0,8^*$) par rapport à celui des chiens non exposés ($2,15 \pm 0,8^*$). Ces résultats sont contraires aux résultats de l'étude de Backet *et al* portant sur la pollution citadine. Cependant, ceux-ci ayant étudié la pollution citadine dans une petite ville des Etats-Unis avec comme exposition des pesticides dans l'eau et des composés organiques volatils dans l'air, les conditions ne sont pas tout à fait similaires. Dans leur étude, le ratio CD4/CD8 est inférieur dans le groupe de 21 chiens exposés ($1.50 \pm 1.0^*$) par rapport aux chiens non exposés ($2.02 \pm 1.2^*$), sans différence significative cependant (Backer *et al.*, 2001). Pour l'exposition à la cigarette, une augmentation d'activité des LTCD8, pouvant entraîner une diminution du ratio CD4/CD8, a été mise en évidence sur des LT de souris *in vitro*. Cette augmentation est liée, dans cette étude, avec une augmentation de la voie Th17 (Duan *et al.*, 2012). Ainsi, une diminution de ce ratio était attendue et non retrouvée dans notre étude. L'étude de Faldyna *et al*, met cependant en évidence une diminution du ratio CD4/CD8 non significative avec l'âge avec un ratio de $2,8 \pm 0,8^*$ pour les chiens entre 3 et 5 ans et un ratio de $1,8 \pm 0,5^*$ pour les chiens de plus de 5 ans. ^{*: Moyenne ± Ecart-type} Si cette différence s'avère applicable à la population globale de chiens sains, les différences mises en évidence de ratio entre notre étude et celle de Backer *et al* peuvent être liées à l'âge des animaux : 3 ans en moyenne dans notre étude contre plus de 5 ans au recrutement dans la leur.

Les valeurs de littérature chez les chiens sains adultes des différents pourcentages cellulaires sont comparées dans le tableau 11 aux valeurs obtenues sur les chiens de cette étude. De manière globale, pour les données de comparaison trouvées dans la littérature, les valeurs obtenues dans cette étude sont comparables aussi bien pour le groupe exposé que non exposés. Aucune valeur de référence n'ont été trouvées pour les monocytes matures et immatures ainsi que pour les LB contaminants et les LT DP et DN. Il est donc difficile de comparer les résultats significatifs sur les monocytes à la littérature car il n'existe pas d'études sur ce sujet chez le chien. Chez l'humain, les fumeurs présentent plus de monocytes, lymphocytes et neutrophiles sanguins que les non-fumeurs mais ces résultats ont été établis par NFS et non cytométrie de flux. Cette différence est attribuée d'après Thomas *et al.* à la moindre présence d'antioxydants et à la moindre

adhésion aux vaisseaux sanguins de ces cellules chez les fumeurs (Thomas et al., 2015). Pour les MDSC, il s'agit de cellules immunosuppressives dont l'augmentation est aujourd'hui reliée avec l'apparition de cancers (Colombe, 2020). On remarque dans le tableau 11 que, bien qu'encore dans les valeurs de référence, la proportion de MDSC est supérieure pour les chiens exposés par rapport aux chiens non exposés.

Tableau 11 : Comparaison des moyennes obtenues lors de cette étude par rapport à la littérature pour les valeurs de littérature sur des chiens sains adultes

Cellules mesurées	Groupe « exposés » (Moyenne ± SD)	Groupe « Non exposés » (Moyenne ± SD)	Valeurs de la littérature
LT	75,3 ± 7	74,8 ± 7	83,7 ± 5,8 ^a
LB	17,6 ± 5,9	16,2 ± 6,1	11,4 ± 3,8 ^a
LTCD4	55,8 ± 7,9	53,4 ± 8,2	45,5 ± 7,5 ^a
LTCD8	25,3 ± 7,3	27,6 ± 7,4	17,5 ± 5,8 ^a
Ratio CD4/CD8	2,37 ± 0,8	2,15 ± 0,8	2,8 ± 0,8 ^a
LT DP	0,9 ± 0,4	0,8 ± 0,3	2,5 ^b
LT DN	18 ± 5,1	18,2 ± 4,7	NT
LB contaminants	14,4 ± 15,3	13,8 ± 10,5	NT
Monocytes matures	52 ± 15,8	70,3 ± 13,7	NT
Monocytes immatures	27,5 ± 21,7	9 ± 9,4	NT
MDSC	5,8 [2,3 ; 7,7] *	1,2 [0,5 ; 7,8] *	0,5 – 7,4 ^c

SD = *Standard deviation* = Ecart-type, NT = Non trouvé dans la littérature

* : Médiane [1^{er} quartile ; 3^{ème} quartile]

^a : d'après la catégorie de Beagle entre 3 et 5 ans de l'étude de Faldyna et al., 2001

^b : d'après Bismarck et al., 2012

^c : intervalle de confiance établi dans l'étude de Colombe, 2020

Des différences de pourcentage de cellules immunitaires en cytométrie de flux sont connues selon la race des chiens. Les chiens de race Beagle présentent plus de lymphocytes, les chiens de race Berger Allemand présentent moins de lymphocytes et un ratio CD4/CD8 plus élevé donc plus de LTCD4 que les autres races (Faldyna *et al.*, 2001). Dans notre étude, une majorité de chiens de type bergers et retrievers sont présents. Certaines données, et notamment le ratio CD4/CD8, ont pu être biaisées par cette observation. L'étude de Faldyna *et al* met aussi en évidence une influence de l'âge des chiens sur les mesures établies en cytométrie de flux. Cet impact est probablement minime dans notre étude car les deux groupes étudiés sont comparables en termes d'âge. Une influence du sexe sur les valeurs usuelles des cellules immunitaires en cytométrie de flux est aussi proposée mais non démontrée dans leur étude (Faldyna *et al.*, 2001). Les deux groupes « exposés » et « non exposés » de notre étude ne sont pas comparables sur le critère sexe avec une majorité

de mâles présents. Ainsi, les résultats différents entre mâles et femelles pourraient être imputable à cette influence.

Une différence significative est établie chez les mâles sur les LT DP du sang. Cependant, celle-ci présente un degré de significativité assez faible ($p = 0,04$). Les LT DP sont traditionnellement des cellules du thymus, précurseurs des LT CD8 et LT CD4. Cependant, dans les années 1980, des études ont mis en évidence la présence de LT DP d'origine non thymique dans le sang périphérique chez l'humain, le porc et d'autres animaux dont le chien. Ces LT DP sont issus de LT CD4 ou LT CD8 qui, lorsqu'ils sont activés, se mettent à exprimer CD8 ou CD4 en plus de leur récepteur caractéristique. Ainsi, la cellule devient doublement positive (von Buttlar *et al.*, 2015). Dans leur étude sur ces LT DP du sang périphérique chez le chien, Bismarck *et al.* mettent en évidence un pourcentage autour de 2,5 % de LT DP avec une influence de l'âge (2% de LT DP pour des animaux de 3 ans contre autour de 3 % pour des chiens de 6 ans). Ils ne mettent en revanche pas en évidence d'influence du sexe sur leurs données ce qui contredit nos résultats (Bismarck *et al.*, 2012). Dans notre étude, les valeurs de LT DP sont inférieures avec des moyennes autour de 0,8%. Chez les mâles exposés au tabagisme passif, la valeur moyenne obtenue est de $1,1 \pm 0,4\%$, plus proche des données fournies par Bismarck *et al.* Ces cellules LT DP du sang périphérique ont un rôle encore mal connu dans le système immunitaire. Lors de la mise en contact de ces cellules avec un Ag, elles se multiplient, augmentent leur expression des récepteurs CMH II et CD25 et diminuent l'expression du récepteur CD62. Elles seraient aussi à l'origine d'une activation des LT mémoire (Bismarck *et al.*, 2012 ; von Buttlar *et al.*, 2015). L'impact de ces cellules sur le fonctionnement du système immunitaire est donc encore mal connu et les résultats obtenus par notre étude pourraient montrer une influence du sexe sur les concentrations de ces cellules dans le sang périphérique des chiens.

3. Discussion sur les résultats d'ELISA cytokines IL-6 et TNF α

Les valeurs obtenues des cytokines inflammatoires IL-6 et TNF α n'ont montré aucune différence significative entre les deux groupes étudiés. Une différence était cependant attendue par les auteurs d'après les publications sur l'humain et le chat au niveau pulmonaire. Aucune donnée sur les expressions sanguines de cytokines d'animaux exposés au tabac n'a été trouvée. En revanche, l'exposition de chiens de traineaux à des polluants comme le PCB et le DDT par l'alimentation (graisse de baleine contaminée) n'a pas montré de différence significative sur l'expression des cytokines IL-6 et TNF α mesurées par qPCR dans le sang et dans le foie de ces chiens (Sonne *et al.*, 2007). Les cytokines sont des molécules dont la demi-vie est souvent courte, ce qui limite par exemple les immunothérapies anti-cancéreuses en médecine humaine (VanDyke *et al.*, 2022). Une exposition chronique telle que celle liée à une exposition à la fumée de tabac ou à l'ingestion de nourriture contaminée, peut entraîner l'absence de détection des modifications d'expressions des cytokines impliquées dans les dysrégulations du système immunitaire. Le faible effectif des études sur les canidés et les polluants peut aussi entrer en considération. Le tableau 12 met cependant en évidence une tendance du groupe « exposés » à avoir une concentration sanguine en IL-6 supérieure aux chiens des groupes contrôles utilisés en comparaison. Cette augmentation pouvant traduire une inflammation systémique innée plus importante chez les chiens exposés au tabagisme passif. Il paraît donc pertinent d'envisager de renouveler les mesures avec un plus grand nombre de chiens. Le tableau 12 montre par ailleurs que les concentrations de la cytokine TNF α des groupes « exposés » et « non exposés » de notre étude est très inférieure à celle du groupe contrôle de l'étude de Calvalido *et al.*, 2016.

Les modifications de concentrations en cytokines sont surtout établies à ce jour au niveau local pulmonaire. Chez le chat par exemple, une augmentation de l'expression des cytokines IL-8, IL-6 et TNF α est observée au niveau pulmonaire (Kolahian *et al.*, 2014). Chez l'humain, c'est plutôt une diminution d'IL-6 et TNF α qui est mise en évidence dans les poumons de personnes fumeuses (McCrea *et al.*, 1994). De plus, il était attendu d'observer une différence de résultats selon le sexe des chiens d'après une étude effectuée sur le lavage bronchoalvéolaire de rats. Dans cette étude, les rats mâles possèdent un lavage broncho-alvéolaire contenant plus de cytokines IL-6 et TNF α ainsi que plus de leucocytes, et notamment de macrophages alvéolaires, que les femelles à la suite de l'exposition au tabagisme passif (Shen *et al.*, 2016). Chez l'humain, l'influence du sexe sur l'expression de cytokines et notamment IL-6 pour des patients souffrant de bronchopneumopathie obstructive chronique (BPCO) lié au tabac a été établi (de Torres *et al.*, 2011). Cependant, les cytokines inflammatoires ayant une action souvent locale, il est possible de ne pas voir d'influence systémique de leur expression. L'étude de ce manuscrit n'a donc pas réussi à montrer d'influence du sexe sur les résultats d'ELISA. Il aurait pu être pertinent de compléter nos analyses en systémique par des mesures locales de cytokines via un lavage broncho-alvéolaire par exemple. Cependant, ce geste technique est bien plus invasif et non réalisable dans le cadre de notre étude.

Pour la cytokine IL-6, les moyennes effectuées sur les différentes mesures réalisées suite au problème de dilution peuvent avoir entraîné des biais par approximation des résultats-

Tableau 12 : Comparaison des valeurs de cytokines obtenues par ELISA sur cette étude et celle de Calvalido *et al.*, 2016

Cytokine mesurée	Groupe « exposés » (pg/mL)	Groupes « Non exposés » (pg/mL)	Valeurs du groupe contrôle de l'étude de Calvalido <i>et al.</i>, 2016* (pg/mL)
IL-6	135,8 [52,7 ; 233,7]	28,5 [6,3 ; 455,9]	13,38 [0,93 ; 370,45]
TNF α	1,6 [1 ; 7,5]	3 [1 ; 19,8]	137,35 [8,03 ; 163,59]

* : Mesure de cytokine par ELISA sur sérum

** : Médiane [1^{er} ; 3^{ème} quartile]

4. Discussion sur les résultats d'ELISA cotinine

Malgré une concentration moyenne plus élevée en cotinine plasmatique chez les chiens du groupe « exposés » (651,5 \pm 379,4 ng/mL) que chez les chiens « non exposés » (531,6 \pm 428,9 ng/mL), aucune différence significative n'est présente entre les deux groupes. Il était attendu d'observer une concentration en cotinine significativement supérieure chez les chiens exposés au tabagisme passif d'après l'étude de Groppetti *et al.* Cependant, en comparant les résultats de notre étude avec celle de Groppetti *et al.*, une différence majeure dans les concentrations de cotinine obtenue est notée. Pour les chiens non exposés au tabagisme passif, l'étude de Groppetti *et al.* obtient une concentration de 1,5 \pm 0.7 ng/mL dans le sérum. Pour les chiens exposés à 1 cpq, groupe dont l'exposition est la plus comparable avec celle de notre étude, une concentration sérique de 4,33 \pm 1.3 ng/mL est obtenue (Groppetti *et al.*, 2023). Un facteur multiplicateur de 100 est présent entre les mesures obtenues par l'étude de ce manuscrit et celle de Groppetti *et al.* Cependant, l'étude de Groppetti *et al.* utilise une méthode ELISA de mesure différente de celle utilisée dans ce manuscrit en utilisant un kit ELISA compétitif et en réalisant cette mesure sur du sérum et non du plasma. Chez l'humain, la mesure de cotinine plasmatique déterminée chez des adolescents non-fumeurs est entre 3 et 5 ng/mL et chez des fumeurs de 15 cigarettes par semaine, entre 5 et 616 ng/mL (Williams

et al., 1979). Les valeurs de concentration en cotinine dans le plasma des chiens de notre étude semblent donc anormalement supérieures aux valeurs de la littérature.

Plusieurs facteurs de variations des mesures peuvent avoir biaisé les résultats. La notice d'utilisation du kit indique d'éviter les cycles répétés de congélation/décongélation des plasmas. Les plasmas stockés à -80°C utilisés ont subi au moins deux cycles de congélation/décongélation avant la réalisation de cette ELISA cotinine. De plus, il est conseillé de ne pas utiliser de plasma présentant une hémolyse trop importante. Comme le montre la figure 27, certains des prélèvements présentaient une hémolyse importante qui peut avoir biaisé les résultats puisque celle-ci peut entraîner des résultats faussement positifs (MyBioSource, 2021). Cela peut avoir engendré les résultats anormalement élevés obtenus et l'absence de significativité entre les deux groupes.

5. Limites de l'étude

Une des premières limites de cette étude réside dans son effectif. Le groupe de chiens « exposés » ne possède que 11 individus. Or d'après le site BiostatsGTV, avec nos données un nombre idéal de 11 à 14 individus aurait été exigé dans chaque groupe pour avoir 80% de chances d'obtenir une différence significative au risque d'erreur α de 5% sur les données étudiées. Cela peut donc avoir engendré l'absence de résultats significativement différents sur certains paramètres de l'étude. Lors de la conception de cette étude, un nombre idéal de 20 individus avait été établi selon d'autres études sur les chiens exposés à un polluant (Backer *et al.*, 2001). Ce nombre n'a pas pu être atteint en raison du faible effectif disponible de chiens exposés, en intérieur ou à la fenêtre, à la cigarette.

De plus, l'exposition quantifiée en cigarettes par jour est faible (1,56 cpg) par rapport à l'étude sur la cotinine effectuée par l'équipe de Groppetti où l'exposition est comprise entre 10 et plus de 10 cpg (Groppetti *et al.*, 2023). Cette exposition faible au tabagisme passif réside aussi dans le fait que celle-ci est très variable au sein de l'étude avec certains chiens dont l'exposition est intermittente (week-ends et vacances) ou d'autres dont l'exposition a surtout lieu dans un milieu peu confiné (fenêtre ouverte par exemple). Chez l'humain, l'inflammation causée par la cigarette est diminuée en 4 mois à 20 ans lors de l'arrêt de la consommation de cigarettes (Ashare et Wetherill, 2018). Les chiens exposés de manière intermittente dans les six derniers mois précédents l'étude pourrait potentiellement présenter une inflammation systémique comme c'est le cas chez l'humain. Cependant, dans les études citées par Ashare et Wetherill, l'inflammation étudiée fait suite à du tabagisme primaire. Les résultats de cotinine obtenus ne montrent pas de différence significative entre les deux groupes mais le groupe « exposés » présentent une moyenne supérieure à celle du groupe « non exposés » (651,5 ng/mL contre 531,6 ng/mL). Ces résultats ne semblent donc pas permettre d'admettre une réelle différence d'exposition entre les deux groupes étudiés. Afin de quantifier l'exposition plus précisément, une autre méthode a été étudiée par les auteurs mais non réalisée faute de financement et de temps. Il s'agit de la quantification du récepteur aryl hydrocarbon AhR cité dans la partie bibliographique section PAH et dioxine. Ce récepteur a fait l'objet de recherches récentes montrant son rôle de dysrégulation de l'immunité dans certaines affections induites par la fumée de cigarette chez l'humain, par exemple la BPCO. Chez les souris étudiées dans ces différentes études, lors de l'exposition à la fumée de cigarette, l'expression du AhR augmente notamment suite au contact avec les molécules PAH et benzo[a]pyrène (Hattori *et al.*, 2022 ; Rogers *et al.*, 2017 ; Stading *et al.*, 2021). De plus, chez l'humain, il est mis en évidence que le récepteur AhR subit une déméthylation chez les fumeurs. Cette déméthylation de AhR est utilisée comme biomarqueur précoce de l'exposition à la cigarette (Philibert *et al.*, 2012). Une étude datant de 2012 met en évidence la possibilité de quantifier ce récepteur par réaction de polymérase en

chaîne quantitative (qPCR) sur de nombreuses cellules et notamment les leucocytes (de Jong, 2012). Ainsi, sur les cellules PBMCs isolées des chiens inclus dans cette étude, il aurait été possible de quantifier ce gène AhR par qPCR afin de mieux déterminer l'exposition des individus.

Dans l'étude de Rao *et al* (2009), l'exposition à la fumée de tabac est corrélée avec une augmentation de l'adhérence à l'endothélium vasculaire et donc de la diapédèse des leucocytes chez l'humain. Or il a été montré un lien entre l'augmentation du récepteur CD11b à la surface des neutrophiles et une diapédèse augmentée de ces cellules lors d'exposition au cadmium, un métal lourd présent en faible quantité dans la cigarette (Djokic *et al.*, 2014). Il serait donc intéressant pour compléter l'étude menée dans ce manuscrit d'y ajouter une comparaison de l'expression du récepteur CD11b à la surface des cellules myéloïdes étudiées chez les chiens exposés au tabagisme passif et non exposés.

Cette étude présente une autre limite : la population canine étudiée est uniquement issue des étudiants et du personnel de l'EnvA. Cela peut engendrer un biais résidant dans le fait que ces propriétaires peuvent avoir plus facilement conscience du risque pour la santé que provoque la fumée de cigarette. Ainsi, les chiens étudiés peuvent avoir été moins exposés de manière volontaire au tabagisme passif.

Certains des chiens inclus dans l'étude ont, par ailleurs, été exposés à d'autres composés pouvant contenir des molécules modifiant les actions du système immunitaire. D'après l'étude bibliographique réalisées précédemment, les PAH sont des molécules émises lors de combustion et sont toxiques pour le système immunitaire. Ainsi, l'exposition de certains chiens de l'étude à de la fumée de cheminée, de la fumée de bougies, de la fumée de cannabis ou encore à de la e-cigarette, peut avoir modifié le statut « non exposés » attribué dans la conception de l'étude lors d'une non-exposition au tabagisme passif dans les six derniers mois.

Concernant les ELISA cytokines, il serait intéressant de reproduire ces mesures par PCR en quantifier les ARNm produits par les cellules immunitaires étudiées afin d'étudier une différence d'expression des cytokines plutôt que la quantité totale de celle-ci dans le plasma. Il pourrait, par ailleurs, être pertinent de compléter cette étude avec l'utilisation d'un ELISA multiplex, comme utilisé dans l'étude de Calvalido *et al.*, 2016, comprenant un grand nombre de cytokines (IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-18, TNF- α , IFN- γ , etc...) et permettant ainsi une vue plus globale de l'effet du tabagisme passif sur le système immunitaire canin. Enfin, une étude locale des différentes cytokines de l'inflammation chez ces chiens peut aussi être intéressante par le biais de lavage broncho-alvéolaire ou de biopsies pulmonaires et des amygdales etc.

Enfin, une étude d'autres paramètres systémiques du système immunitaire serait intéressante. En effet, chez les fumeurs une diminution des IgA et IgM sériques est mis en évidence par rapport aux non-fumeurs (Ferson *et al.*, 1979). Ainsi, compléter l'étude de ce manuscrit avec le dosage plasmatique des IgA et IgM, voir IgG, totales chez les chiens exposés et non exposés au tabagisme passif peut s'avérer instructif pour mieux comprendre l'impact du tabac sur leur système immunitaire. De plus, une augmentation d'AAN dans le sang des fumeurs est aussi démontrée chez l'humain, favorisant par la suite le développement de maladies auto-immunitaires (Mathews *et al.*, 1973). Il serait donc intéressant d'envisager un suivi longitudinal des AAN chez les chiens inclus dans l'étude et de contrôler l'apparition de maladies auto-immunes telles que le lupus par exemple.

Conclusion

L'objectif de cette thèse était d'effectuer un bilan sur ce qui est connu et méconnu de l'impact de la pollution sur le système immunitaire des animaux aussi bien domestiques que sauvages. La partie bibliographique met en avant de nombreux polluants aussi bien des sols, de l'eau ou encore de l'air, qui ont un impact connu sur le système immunitaire de l'humain et des animaux. Les principaux polluants à risque pour les animaux semblent être les métaux lourds, les POPs, qui subissent une bioaccumulation importante, les pesticides, les microplastiques et les perturbateurs endocriniens tels que le bisphénol A. De plus avec le réchauffement climatique et l'augmentation du risque d'incendies de feux de forêts, l'impact de la fumée sur les animaux aussi bien domestiques que sauvages reste encore à étudier. La pollution de l'air en zone urbaine semble aussi avoir un impact non négligeable sur le système immunitaire de nos animaux de compagnie. Cependant, il ressort que peu d'études ont été effectuées pour étudier l'impact de la pollution sur les animaux de compagnie et les animaux sauvages. La complexité de l'exposition complique d'autant plus leur réalisation. En effet, il est rare de pouvoir étudier l'impact d'un seul des polluants cités précédemment sur la faune sauvage car celle-ci est souvent en contact de plusieurs polluants.

Les animaux marins sont les plus étudiés pour comprendre l'impact des polluants présents dans l'eau sur le système immunitaire (plastiques, POP, métaux lourds etc...). Ces animaux étant particulièrement sujet à la bioaccumulation, il est plus facile d'étudier ces populations d'animaux sauvages. Les risques mis en évidence sur la santé des animaux sont tout d'abord des risques augmentés de développer des cancers, des maladies auto-immunitaires ou encore de développer plus facilement des infections bactériennes, virales ou parasitaires. Le contact avec les différents polluants entraîne globalement un système immunitaire dont l'action est modifiée. Celui-ci devient alors insuffisant pour lutter contre les infections ou contre le développement de cellules cancéreuses, ou devient incontrôlé et entraîne le développement de maladies auto-immunitaires. Ces différentes affections entraînent une moindre possibilité de reproduction des animaux sauvages et donc une diminution de leur effectif qui à terme peut s'avérer un véritable danger (Beineke *et al.*, 2005).

Afin d'approfondir la compréhension de l'impact de la pollution sur le système immunitaire, l'exemple du tabagisme a été choisi dans cette étude. Si les impacts du tabagisme actif primaire sont très explorés chez l'humain, l'impact du tabagisme passif est moins clair. Chez l'humain, il serait à l'origine notamment de cancers des poumons ou du sein et de maladies respiratoires et cardiovasculaires. L'impact du tabac sur les animaux est bien moins connu. La principale utilisation des animaux en lien avec le tabac est en recherche pour comprendre l'impact de celui-ci sur l'humain. Ainsi, l'impact du tabagisme passif sur les animaux est surtout connu sur les rongeurs de laboratoire ou les singes et bien moins sur nos animaux domestiques pouvant pourtant y être exposés de manière importante et vivant dans le même environnement que leurs propriétaires. D'après les quelques études menées au niveau local pulmonaire, le tabagisme passif entraîne une augmentation de l'inflammation locale aussi bien chez le chien que chez le chat et pourrait donc favoriser des affections pulmonaires telles que l'asthme félin par exemple (Abrams *et al.*, 1988 ; Kolahian *et al.*, 2014 ; Park *et al.*, 1977 ; Yamaya *et al.*, 1989). Chez le chien, il est aussi montré que le tabagisme passif favorise le développement de troubles dermatologiques en accentuant les signes de dermatite atopique (Ka, 2011). Cependant, l'impact du tabagisme passif sur le système immunitaire systémique des animaux est très mal renseigné dans la littérature.

Afin d'approfondir les données actuelles sur le tabagisme passif et le système immunitaire des animaux de compagnie, l'auteur de ce manuscrit a réalisé sous la supervision du Dr Delphine Le Roux au laboratoire du BioPôle Alfort, une étude observationnelle transversale sur 40 chiens dont 11 exposés au tabagisme passif à la hauteur d'environ 1,56 cigarettes par jour et 29 non exposés dans les six derniers mois. Cette étude met en évidence plusieurs pistes d'études futures. Des différences significatives sont mises en évidence sur les pourcentages de monocytes sanguins isolés par cytométrie de flux sur les PBMCs des chiens. Les monocytes matures sont en nombre inférieur chez les chiens exposés par rapport aux chiens non exposés (46,3% [44,8 – 68,1] contre 73,4% [58,9 – 83], $p < 0,01$). En revanche, les monocytes immatures sont en nombre supérieur (20,4% [7,15 – 43,9] contre 5% [3,1 – 10,7], $p < 0,01$). Par ailleurs, une différence est aussi mise en évidence sur ces mêmes mesures selon le sexe de l'animal. En effet, les différences significatives précédemment citées sont présentes uniquement chez les femelles avec pour les monocytes matures une médiane de 45,3% [37,2 – 52,7] contre 75,6% [66,4 – 78,8] ($p = 0,02$) et pour les monocytes immatures une médiane de 21,4% [20,4 – 41,9] contre 4,9% [3,1 – 5,3] ($p = 0,01$). En revanche, il n'est pas possible d'inférer les résultats de cette étude à la population de chiens domestiques. En effet, la construction de l'étude ne permet pas de garantir l'antériorité de l'exposition au tabagisme passif par rapport aux modifications biologiques observées, critère indispensable pour élargir les résultats obtenus à la population générale de chiens. Par ailleurs, l'absence de biais n'est pas non plus garantie. Une autre différence significative a été mise en évidence sur les LT CD4+ CD8+ double positif chez les chiens mâles (1% [0,9 – 1,4] contre 0,8% [0,7 – 0,9], $p = 0,04$). Ces lymphocytes sanguins, dont le rôle dans le système immunitaire canin est à ce jour méconnu, résultent de l'activation d'un LTCD4 ou LTCD8 qui va ensuite exprimer le deuxième récepteur CD8 ou CD4 à sa surface. Enfin, les autres données étudiées dans cette étude ; c'est-à-dire les mesures de NFS, cytokines sanguines IL-6 et TNF α et LT, LB, LTCD4 et LTCD8 en cytométrie de flux ; ont présentées des différences intéressantes ne se montrant cependant pas significatives. Cela peut être lié à plusieurs limites de cette étude et notamment le manque d'effectif et la faible exposition des chiens exposés au tabagisme passif.

Cette étude donne donc des perspectives de recherches plus approfondies sur l'impact systémique du tabagisme passif sur le système immunitaire de nos animaux de compagnie. L'utilisation des monocytes comme population cellulaire d'intérêt est intéressante à suivre pour étudier l'impact du tabagisme passif chez le chien par rapport à d'autres paramètres classiquement cités dans d'autres études comme le ratio lymphocytes/neutrophiles (à partir de NFS) ou le ration CD4/CD8 (à partir de cytométrie de flux) par exemple. Cette différence incluant un nombre inférieur de monocytes matures dans le sang pourrait avoir des impacts sur leur fonctionnalité ou encore un afflux moindre dans les tissus lors d'inflammation ou d'infection de ces cellules. Il serait donc intéressant de mieux caractériser ces populations monocytaires avec d'autres marqueurs en cytométrie de flux ou encore d'étudier les cytokines qu'elles produisent pour établir un lien entre leur fonctionnalité et la différence observée.

Pour compléter les résultats de cette étude, il serait aussi intéressant d'effectuer les mesures de cytokines et les mesures effectuées en cytométrie de flux sur un nombre plus importants de chiens exposés au tabagisme passif en intérieur avec une quantification de l'exposition autour de 12,7 cigarettes par jour, consommation moyenne de cigarettes par un fumeur entre 18 et 75 ans en 2021 (Pasquereau *et al.*, 2022).

Liste des références bibliographiques

- ABBAS, LICHTMAN (2008) Basic Immunology, 3rd Edition. Elsevier.
- ABRAMS, W.R., KUCICH, U., KIMBEL, P., *et al.* (1988) Acute cigarette smoke exposure in dogs: the inflammatory response. *Experimental Lung Research* vol. 14, n° 4, p. 459-475. [https://doi.org/10.3109/01902148809087821]
- AHMED, S., MOORE, S.E., KIPPLER, M., *et al.* (2014) Arsenic Exposure and Cell-Mediated Immunity in Pre-School Children in Rural Bangladesh. *Toxicological Sciences* vol. 141, n° 1, p. 166-175. [https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu113]
- AIRPARIF (2022) Bilan 2021 de la qualité de l'air - Île-de-France. In *Airparif*. [https://www.airparif.fr/bilan/2022/bilan-2021-de-la-qualite-de-lair] (consulté le 06/04/2023).
- AIRPARIF (2021) Composés organiques volatils. In *Airparif*. [https://www.airparif.asso.fr/composes-organiques-volatils] (consulté le 10/04/2023).
- AIRPARIF (2019) Canicule et ozone - Situation au 27/06/2019. In *Airparif*. [https://www.airparif.asso.fr/actualite/2019/canicule-et-ozone-situation-au-27062019] (consulté le 09/04/2023).
- ALBERT, Q. (2017) Bacteriology and cancers : towards new therapeutic strategies. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Caen, Université de Caen Normandie. [https://doi.org/10.13140/RG.2.2.35929.52326]
- ALBRIGHT, J.F., GOLDSTEIN, R.A. (1996) Airborne Pollutants and the Immune System. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* vol. 114, n° 2, p. 232-238. [https://doi.org/10.1016/S0194-59989670173-0]
- ALKHARASHI, N.A.O., PERIASAMY, V.S., ATHINARAYANAN, J., *et al.* (2017) Cadmium triggers mitochondrial oxidative stress in human peripheral blood lymphocytes and monocytes: Analysis using in vitro and system toxicology approaches. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* vol. 42, p. 117-128. [https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.04.014]
- AMERICAN LUNG ASSOCIATION (2023) E-cigarette or Vaping Use-Associated Lung Injury (EVALI). [https://www.lung.org/lung-health-diseases/lung-disease-lookup/evali] (consulté le 21/04/2023).
- AMZAL, B., JULIN, B., VAHTER, M., *et al.* (2009) Population Toxicokinetic Modeling of Cadmium for Health Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives* vol. 117, n° 8, p. 1293-1301. [https://doi.org/10.1289/ehp.0800317]
- ANDERSON, A., REZAMAND, P., SKIBIEL, A.L. (2022) Effects of wildfire smoke exposure on innate immunity, metabolism, and milk production in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* vol. 105, n° 8, p. 7047-7060. [https://doi.org/10.3168/jds.2022-22135]
- ANDRADY, A.L. (2011) Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* vol. 62, n° 8, p. 1596-1605. [https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030]
- ANIOŁEK, O., GAJEWSKI, Z., GIZINSKI, S. (2014) Experimental immunology Application of flow cytometry in diagnosing lymphomas in dogs and cats. *Central European Journal of Immunology* vol. 3, p. 327-330. [https://doi.org/10.5114/ceji.2014.45943]
- ANSES (2012) PCB, carte d'identité. In *Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*. [https://www.anses.fr/fr/content/pcb-carte-d%E2%80%99identit%C3%A9] (consulté le 28/03/2023).
- ARANGO, M.-T., PERRICONE, C., KIVITY, S., *et al.* (2017) HLA-DRB1 the notorious gene in the mosaic of autoimmunity. *Immunologic Research* vol. 65, n° 1, p. 82-98. [https://doi.org/10.1007/s12026-016-8817-7]

- ARAVINDAKSHAN, J., GREGORY, M., MARCOGLIESE, D.J., *et al.* (2004a) Consumption of Xenoestrogen-Contaminated Fish during Lactation Alters Adult Male Reproductive Function. *Toxicological Sciences* vol. 81, n° 1, p. 179-189. [<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh174>]
- ARAVINDAKSHAN, J., PAQUET, V., GREGORY, M., *et al.* (2004b) Consequences of Xenoestrogen Exposure on Male Reproductive Function in Spottail Shiners (*Notropis hudsonius*). *Toxicological Sciences* vol. 78, n° 1, p. 156-165. [<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh042>]
- ARIS, R.M., CHRISTIAN, D., HEARNE, P.Q., *et al.* (1993) Ozone-induced Airway Inflammation in Human Subjects as Determined by Airway Lavage and Biopsy. *American Review of Respiratory Disease* vol. 148, n° 5, p. 1363-1372. [<https://doi.org/10.1164/ajrccm/148.5.1363>]
- ASHARE, R.L., WETHERILL, R.R. (2018) The Intersection of Sex Differences, Tobacco Use, and Inflammation: Implications for Psychiatric Disorders. *Current Psychiatry Reports* vol. 20, n° 9, p. 75. [<https://doi.org/10.1007/s11920-018-0946-3>]
- BACKER, L.C., GRINDEM, C.B., CORBETT, W.T., *et al.* (2001) Pet dogs as sentinels for environmental contamination. *Science of The Total Environment, Toxicology and Risk Assessment Approaches* vol. 274, n° 1, p. 161-169. [[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)00740-9](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)00740-9)]
- BAGATH, M., KRISHNAN, G., DEVARAJ, C., *et al.* (2019) The impact of heat stress on the immune system in dairy cattle: A review. *Research in Veterinary Science* vol. 126, p. 94-102. [<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.08.011>]
- BAKER, R.R., PEREIRA DA SILVA, J.R., SMITH, G. (2004) The effect of tobacco ingredients on smoke chemistry. Part I: Flavourings and additives. *Food and Chemical Toxicology* vol. 42, p. 3-37. [[https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(03\)00189-3](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(03)00189-3)]
- BALAN, S., SAXENA, M., BHARDWAJ, N. (2019) Chapter One - Dendritic cell subsets and locations. In Lhuillier, C., Galluzzi, L. (Éd.), *International Review of Cell and Molecular Biology, Immunobiology of Dendritic Cells Part A*. Amsterdam, Elsevier, p. 1-68. [<https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2019.07.004>]
- BAŞARAN, N., ÜNDEĞER, Ü. (2000) Effects of lead on immune parameters in occupationally exposed workers. *American Journal of Industrial Medicine* vol. 38, n° 3, p. 349-354. [[https://doi.org/10.1002/1097-0274\(200009\)38:3<349::AID-AJIM16>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1097-0274(200009)38:3<349::AID-AJIM16>3.0.CO;2-Z)]
- BEINEKE, A., SIEBERT, U., MCLACHLAN, M., *et al.* (2005) Investigations of the Potential Influence of Environmental Contaminants on the Thymus and Spleen of Harbor Porpoises (*Phocoena phocoena*). *Environmental Science & Technology* vol. 39, n° 11, p. 3933-3938. [<https://doi.org/10.1021/es048709j>]
- BERNHOF, R.A. (2013) Cadmium Toxicity and Treatment. *The Scientific World Journal* vol. 2013, p. 394652. [<https://doi.org/10.1155/2013/394652>]
- BISER, J.A., VOGEL, L.A., BERGER, J., *et al.* (2004) Effects of heavy metals on immunocompetence of white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *Journal of Wildlife Diseases* vol. 40, n° 2, p. 173-184. [<https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.2.173>]
- BISMARCK, D., SCHÜTZE, N., MOORE, P., *et al.* (2012) Canine CD4+CD8+ double positive T cells in peripheral blood have features of activated T cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* vol. 149, n° 3, p. 157-166. [<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.06.014>]
- BISWAS, R., GHOSH, P., BANERJEE, N., *et al.* (2008) Analysis of T-cell proliferation and cytokine secretion in the individuals exposed to arsenic. *Human & Experimental Toxicology* vol. 27, n° 5, p. 381-386. [<https://doi.org/10.1177/0960327108094607>]
- BLACK, C., GERRIETS, J.E., FONTAINE, J.H., *et al.* (2017) Early Life Wildfire Smoke Exposure Is Associated with Immune Dysregulation and Lung Function Decrements in Adolescence. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* vol. 56, n° 5, p. 657-666. [<https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-03800C>]

- BLACKBURN, K., GREEN, D. (2022) The potential effects of microplastics on human health: What is known and what is unknown. *Ambio* vol. 51, n° 3, p. 518-530. [https://doi.org/10.1007/s13280-021-01589-9]
- BONILLA, F.A., OETTGEN, H.C. (2010) Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 125, n° 2, Supplement 2, p. S33-S40. [https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017]
- BORBA, V.V., ZANDMAN-GODDARD, G., SHOENFELD, Y. (2018) Prolactin and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology* vol. 9, p. 73. [https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00073]
- BORGERDING, M., KLUS, H. (2005) Analysis of complex mixtures – Cigarette smoke. *Experimental and Toxicologic Pathology* vol. 57, p. 43-73. [https://doi.org/10.1016/j.etp.2005.05.010]
- BOULÉ, L.A., CHAPMAN, T.J., HILLMAN, S.E., *et al.* (2018) Developmental Exposure to a Mixture of 23 Chemicals Associated With Unconventional Oil and Gas Operations Alters the Immune System of Mice. *Toxicological Sciences* vol. 163, n° 2, p. 639-654. [https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy066]
- BOURGÈS-ABELLA, N.H., GURY, T.D., GEFFRÉ, A., *et al.* (2015) Reference Intervals, Intraindividual and Interindividual Variability, and Reference Change Values for Hematologic Variables in Laboratory Beagles. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* vol. 54, n° 1, p. 17-24.
- BØYUM, A. (1976) Isolation of Lymphocytes, Granulocytes and Macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology* vol. 5, p. 9-15. [https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1976.tb03851.x]
- BRENNECKE, D., DUARTE, B., PAIVA, F., *et al.* (2016) Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* vol. 178, p. 189-195. [https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.12.003]
- BRIFFA, J., SINAGRA, E., BLUNDELL, R. (2020) Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon* vol. 6, n° 9, p. e04691. [https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691]
- BROWNE, M.A., CRUMP, P., NIVEN, S.J., *et al.* (2011) Accumulation of Microplastic on Shorelines Worldwide: Sources and Sinks. *Environmental Science & Technology* vol. 45, n° 21, p. 9175-9179. [https://doi.org/10.1021/es201811s]
- BUNN, T.L., PARSONS, P.J., KAO, E., *et al.* (2001) Gender-Based Profiles of Developmental Immunotoxicity to Lead in the Rat: Assessment in Juveniles and Adults. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* vol. 64, n° 3, p. 223-240. [https://doi.org/10.1080/15287390152543708]
- BURRELL, G.A., SEIBERT, F.M. (1914) Experiments with Small Animals and Carbon Monoxide. *Journal of Industrial & Engineering Chemistry* vol. 6, n° 3, p. 241-244. [https://doi.org/10.1021/ie50063a027]
- BUTERIN, T., KOCH, C., NAEGELI, H. (2006) Convergent transcriptional profiles induced by endogenous estrogen and distinct xenoestrogens in breast cancer cells. *Carcinogenesis* vol. 27, n° 8, p. 1567-1578. [https://doi.org/10.1093/carcin/bgi339]
- BYRNE, K.M., KIM, H.W., CHEW, B.P., *et al.* (2000) A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* vol. 73, n° 2, p. 167-182. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00163-4]
- CALIFORNIA ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY: AIR RESOURCES (2005) Proposed Identification of Environmental Tobacco Smoke as a Toxic Air Contaminant. *In Escholarship*. [https://ideas.repec.org/p/cdl/ctres/qt8hk6960q.html] (consulté le 11/04/2023).

- CALVALIDO, J., WOOD, G.A., MUTSAERS, A.J., *et al.* (2016) Comparison of serum cytokine levels between dogs with multicentric lymphoma and healthy dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* vol. 182, p. 106-114. [<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.10.009>]
- CANESI, L., CIACCI, C., BERGAMI, E., *et al.* (2015) Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*. *Marine Environmental Research* vol. 111, p. 34-40. [<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.008>]
- CANESI, L., PROCHÁZKOVÁ, P. (2014) Chapter 7 - The Invertebrate Immune System as a Model for Investigating the Environmental Impact of Nanoparticles. In Boraschi, D., Duschl, A. (Éd.), *Nanoparticles and the Immune System*. Amsterdam, Elsevier, p. 91-112. [<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408085-0.00007-8>]
- CARPENTER, D.O. (2016) Hydraulic fracturing for natural gas: impact on health and environment: *Reviews on Environmental Health* vol. 31, n° 1, p. 47-51. [<https://doi.org/10.1515/reveh-2015-0055>]
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2022) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Factsheet. In *National Biomonitoring Program*. [https://www.cdc.gov/biomonitoring/PAHs_FactSheet.html] (consulté le 28/03/2023).
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2020) Thimerosal and Vaccines | Vaccine Safety | CDC. [<https://www.cdc.gov/vaccinesafety/concerns/thimerosal/index.html>] (consulté le 27/03/2023).
- CENTRE INTERNATIONAL DE RECHERCHE SUR LE CANCER (1993) Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry. Lyon, International Agency for Research on Cancer.
- CHEN, S., GOLEMBOSKI, K.A., SANDERS, F.S., *et al.* (1999) Persistent effect of in utero meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) on immune function and lead-induced immunotoxicity. *Toxicology* vol. 132, n° 1, p. 67-79. [[https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(98\)00139-5](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(98)00139-5)]
- CHEN, X., WANG, G., LI, X., *et al.* (2013) Environmental level of cadmium exposure stimulates osteoclasts formation in male rats. *Food and Chemical Toxicology* vol. 60, p. 530-535. [<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.017>]
- CHENG, T. (2014) Chemical evaluation of electronic cigarettes. *Tobacco Control* vol. 23, p. ii11-ii17. [<https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2013-051482>]
- CHORMARE, R., KUMAR, M.A. (2022) Environmental health and risk assessment metrics with special mention to biotransfer, bioaccumulation and biomagnification of environmental pollutants. *Chemosphere* vol. 302, p. 134836. [<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134836>]
- CHWALBA, A., MAKSYM, B., DOBRAKOWSKI, M., *et al.* (2018) The effect of occupational chronic lead exposure on the complete blood count and the levels of selected hematopoietic cytokines. *Toxicology and Applied Pharmacology* vol. 355, p. 174-179. [<https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.05.034>]
- COCHET FAIVRE, N. (2022) Polycopié de dermatologie Tome 1. Maisons-Alfort, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort UC 414 Pathologie médicale et thérapeutique 2 Ophtalmologie, Dermatologie.
- COLOMBE, P. (2020) Les biomarqueurs sanguins en oncologie comparée - état actuel des connaissances en 2020 - application aux cellules myéloïdes suppressives canines. Thèse de médecine vétérinaire. Maisons-Alfort, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.
- CORNELL UNIVERSITY COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE (2019) Hematology (Advia 2120). In *Cornell University College of Veterinary Medicine*. [<https://www.vet.cornell.edu/animal-health-diagnostic-center/laboratories/clinical-pathology/reference-intervals/hematology>] (consulté le 07/08/2023).

- CREATIVE BIOLABS (2023) Sandwich ELISA with Streptavidin-biotin Detection. [https://www.antibody-creativebiolabs.com/sandwich-elisa-with-streptavidin-biotin-detection.htm] (consulté le 09/10/2023).
- CUFF, C.F., ZHAO, W., NUKUI, T., *et al.* (1996) 3,4-Dichloropropionanilide-Induced Atrophy of the Thymus: Mechanisms of Toxicity and Recovery. *Fundamental and Applied Toxicology* vol. 33, n° 1, p. 83-90. [https://doi.org/10.1006/faat.1996.0145]
- DANGLEBEN, N.L., SKIBOLA, C.F., SMITH, M.T. (2013) Arsenic immunotoxicity: a review. *Environmental Health* vol. 12, p. 73. [https://doi.org/10.1186/1476-069X-12-73]
- DARBRE, P.D. (2006) Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* vol. 20, n° 1, p. 121-143. [https://doi.org/10.1016/j.beem.2005.09.007]
- DAS, K., SIEBERT, U., GILLET, A., *et al.* (2008) Mercury immune toxicity in harbour seals: links to in vitro toxicity. *Environmental Health* vol. 7, n° 1, p. 52. [https://doi.org/10.1186/1476-069X-7-52]
- DAS, K.K., REDDY, R.C., BAGOJI, I.B., *et al.* (2019) Primary concept of nickel toxicity – an overview. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* vol. 30, n° 2, p. 141-152. [https://doi.org/10.1515/jbcpp-2017-0171]
- DE JONG, T. (2012) Transcript detection of the AHR gene in the dog. Department of Clinical Sciences of Companion Animals Research Project Veterinary Medicine – Utrecht University.
- DESFORGES, J.-P.W., SONNE, C., LEVIN, M., *et al.* (2016) Immunotoxic effects of environmental pollutants in marine mammals. *Environment International* vol. 86, p. 126-139. [https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.007]
- DE TORRES, J.P., CASANOVA, C., PINTO-PLATA, V., *et al.* (2011) Gender Differences in Plasma Biomarker Levels in a Cohort of COPD Patients: A Pilot Study. *PLoS One* vol. 6, n° 1, p. e16021. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016021]
- DÉTRÉE, C., GALLARDO-ESCARATE, C. (2018) Single and repetitive microplastics exposures induce immune system modulation and homeostasis alteration in the edible mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish & Shellfish Immunology* vol. 83, p. 52-60. [https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.018]
- DE WIT, C.A. (2002) An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* vol. 46, n° 5, p. 583-624. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00225-9]
- DIETERT, R.R., PIEPENBRINK, M.S. (2006) Lead and Immune Function. *Critical Reviews in Toxicology* vol. 36, n° 4, p. 359-385. [https://doi.org/10.1080/10408440500534297]
- DJOKIC, J., NINKOV, M., MIRKOV, I., *et al.* (2014) Differential effects of cadmium administration on peripheral blood granulocytes in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* vol. 37, n° 1, p. 210-219. [https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.11.026]
- DUAN, M.-C., HUANG, Y., ZHONG, X.-N., *et al.* (2012) Th17 Cell Enhances CD8 T-Cell Cytotoxicity via IL-21 Production in Emphysema Mice. *Mediators of Inflammation* vol. 2012, p. e898053. [https://doi.org/10.1155/2012/898053]
- DUAN, X., XU, G., LI, J., *et al.* (2022) Arsenic Induces Continuous Inflammation and Regulates Th1/Th2/Th17/Treg Balance in Liver and Kidney In Vivo. *Mediators of Inflammation* vol. 2022, p. 8414047. [https://doi.org/10.1155/2022/8414047]
- DUFFUS, J.H. (2002) « Heavy metals » a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* vol. 74, n° 5, p. 793-807. [https://doi.org/10.1351/pac200274050793]
- EFSA (2021) Retardateurs de flamme bromés | EFSA. [https://www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/brominated-flame-retardants] (consulté le 28/03/2023).
- EL-FAWAL, H.A., WATERMAN, S.J., DE FEO, A., *et al.* (1999) Neuroimmunotoxicology: humoral assessment of neurotoxicity and autoimmune mechanisms. *Environmental Health Perspectives* vol. 107, n° Suppl 5, p. 767-775.

- ELSNER, M., HOELZER, K. (2016) Quantitative Survey and Structural Classification of Hydraulic Fracturing Chemicals Reported in Unconventional Gas Production. *Environmental Science & Technology* vol. 50, n° 7, p. 3290-3314. [<https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02818>]
- EL-TARABANY, M.S. (2016) Impact of cage stocking density on egg laying characteristics and related stress and immunity parameters of Japanese quails in subtropics. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* vol. 100, n° 5, p. 893-901. [<https://doi.org/10.1111/jpn.12404>]
- ERIKSEN, M., LEBRETON, L.C.M., CARSON, H.S., *et al.* (2014) Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS One* vol. 9, n° 12, p. e111913. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111913>]
- FALDYNA, M., LEVÁ, L., KNÖTIGOVÁ, P., *et al.* (2001) Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs — a flow cytometric study. *Veterinary Immunology and Immunopathology* vol. 82, n° 1, p. 23-37. [[https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00337-3](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00337-3)]
- FERRECCIO, C., GONZÁLEZ, C., MILOSAVJLEVIC, V., *et al.* (2000) Lung Cancer and Arsenic Concentrations in Drinking Water in Chile. *Epidemiology* vol. 11, n° 6, p. 673-679.
- FERSON, M., EDWARDS, A., LIND, A., *et al.* (1979) Low natural killer-cell activity and immunoglobulin levels associated with smoking in human subjects. *International Journal of Cancer* vol. 23, n° 5, p. 603-609. [<https://doi.org/10.1002/ijc.2910230504>]
- FLORANCE, I., RAMASUBBU, S., MUKHERJEE, A., *et al.* (2021) Polystyrene nanoplastics dysregulate lipid metabolism in murine macrophages in vitro. *Toxicology* vol. 458, p. 152850. [<https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152850>]
- FLOURIS, A.D., CHORTI, M.S., POULIANITI, K.P., *et al.* (2013) Acute impact of active and passive electronic cigarette smoking on serum cotinine and lung function. *Inhalation Toxicology* vol. 25, n° 2, p. 91-101. [<https://doi.org/10.3109/08958378.2012.758197>]
- FLOURIS, A.D., POULIANITI, K.P., CHORTI, M.S., *et al.* (2012) Acute effects of electronic and tobacco cigarette smoking on complete blood count. *Food and Chemical Toxicology* vol. 50, n° 10, p. 3600-3603. [<https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.025>]
- FRANGOS, T., MARET, W. (2020) Zinc and Cadmium in the Aetiology and Pathogenesis of Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. *Nutrients* vol. 13, n° 1, p. E53. [<https://doi.org/10.3390/nu13010053>]
- FRANKEN, L., SCHIWON, M., KURTS, C. (2016) Macrophages: sentinels and regulators of the immune system. *Cellular Microbiology* vol. 18, n° 4, p. 475-487. [<https://doi.org/10.1111/cmi.12580>]
- FROST, L.L., NEELEY, Y.X., SCHAFFER, R., *et al.* (2001) Propanil Inhibits Tumor Necrosis Factor- α Production by Reducing Nuclear Levels of the Transcription Factor Nuclear Factor- κ B in the Macrophage Cell Line IC-21. *Toxicology and Applied Pharmacology* vol. 172, n° 3, p. 186-193. [<https://doi.org/10.1006/taap.2001.9153>]
- FUTURA, AFP-RELAXNEWS (2019) Cigarette électronique : fin du mystère de la maladie pulmonaire aux États-Unis ? *In Futura sciences*. [<https://www.futura-sciences.com/sante/actualites/maladie-cigarette-electronique-fin-mystere-maladie-pulmonaire-etats-unis-77511/>] (consulté le 21/04/2023).
- GAO, D., MONDAL, T.K., LAWRENCE, D.A. (2007) Lead effects on development and function of bone marrow-derived dendritic cells promote Th2 immune responses. *Toxicology and Applied Pharmacology* vol. 222, n° 1, p. 69-79. [<https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.04.001>]
- GAO, Z., NISSEN, J.C., JI, K., *et al.* (2014) The Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Disease Course Is Modulated by Nicotine and Other Cigarette Smoke Components. *PLoS One* vol. 9, n° 9, p. e107979. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107979>]
- GARCIA-ARCOS, I., GERAGHTY, P., BAUMLIN, N., *et al.* (2016) Chronic electronic cigarette exposure in mice induces features of COPD in a nicotine-dependent manner. *Thorax* vol. 71, n° 12, p. 1119-1129. [<https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-208039>]

- GÉNÉRATION SANS TABAC (2019) Les différents courants de la fumée de tabac et ses dangers. *Génération sans tabac*. [<https://www.generationsanstabac.org/actualites/les-differents-courants-de-la-fumee-de-tabac/>] (consulté le 11/04/2023).
- GHIO, A.J., CARRAWAY, M.S., MADDEN, M.C. (2012) Composition of Air Pollution Particles and Oxidative Stress in Cells, Tissues, and Living Systems. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* vol. 15, n° 1, p. 1-21. [<https://doi.org/10.1080/10937404.2012.632359>]
- GIVAN, A.L. (2001) Chapter 2 Principles of flow cytometry: An overview. Amsterdam, Elsevier, p. 19-50. [[https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(01\)63006-1](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(01)63006-1)]
- GLENCROSS, D.A., HO, T.-R., CAMIÑA, N., *et al.* (2020) Air pollution and its effects on the immune system. *Free Radical Biology and Medicine* vol. 151, p. 56-68. [<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.01.179>]
- GOYAL, T., MITRA, P., SINGH, P., *et al.* (2021) Alterations in Th17 and Treg Lymphocyte Subset in Workers Occupationally Exposed to Lead. *Biological Trace Element Research* vol. 199, n° 5, p. 1693-1700. [<https://doi.org/10.1007/s12011-020-02294-6>]
- GREVEN, A.-C., MERK, T., KARAGÖZ, F., *et al.* (2016) Polycarbonate and polystyrene nanoplastic particles act as stressors to the innate immune system of fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* vol. 35, n° 12, p. 3093-3100. [<https://doi.org/10.1002/etc.3501>]
- GROPETTI, D., PIZZI, G., PECILE, A., *et al.* (2023) Cotinine as a Sentinel of Canine Exposure to Tobacco Smoke. *Animals* vol. 13, n° 4, p. 693. [<https://doi.org/10.3390/ani13040693>]
- GU, Y.-Z., HOGENESCH, J.B., BRADFIELD, C.A. (2000) The PAS Superfamily: Sensors of Environmental and Developmental Signals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* vol. 40, n° 1, p. 519-561. [<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.519>]
- GUI, D., YU, R., HE, X., *et al.* (2014) Bioaccumulation and biomagnification of persistent organic pollutants in Indo-Pacific humpback dolphins (*Sousa chinensis*) from the Pearl River Estuary, China. *Chemosphere* vol. 114, p. 106-113. [<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.028>]
- GUILLETTE, L.J., CRAIN, D.A., ROONEY, A.A., *et al.* (1995) Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environmental Health Perspectives* vol. 103, n° suppl 7, p. 157-164. [<https://doi.org/10.1289/ehp.95103s7157>]
- HADWIGER, M.E., TREHY, M.L., YE, W., *et al.* (2010) Identification of amino-tadalafil and rimonabant in electronic cigarette products using high pressure liquid chromatography with diode array and tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* vol. 1217, n° 48, p. 7547-7555. [<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.018>]
- HÄGGQVIST, B., HAVARINASAB, S., BJÖRN, E., *et al.* (2005) The immunosuppressive effect of methylmercury does not preclude development of autoimmunity in genetically susceptible mice. *Toxicology* vol. 208, n° 1, p. 149-164. [<https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.11.020>]
- HAMANO, R., TAKAHASHI, H.K., IWAGAKI, H., *et al.* (2006) Stimulation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor inhibits CD14 and the toll-like receptor 4 expression in human monocytes. *Shock* vol. 26, n° 4, p. 358. [<https://doi.org/10.1097/01.shk.0000228168.86845.60>]
- HARKEMA, J.R., PLOPPER, C.G., HYDE, D.M., *et al.* (1987) Effects of an ambient level of ozone on primate nasal epithelial mucosubstances. Quantitative histochemistry. *The American Journal of Pathology* vol. 127, n° 1, p. 90-96.
- HATCH, G.E., SLADE, R., HARRIS, L.P., *et al.* (1994) Ozone dose and effect in humans and rats. A comparison using oxygen-18 labeling and bronchoalveolar lavage. *American journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. [<https://doi.org/10.1164/ajrccm.150.3.8087337>]

- HATTORI, N., NAKAGAWA, T., YONEDA, M., *et al.* (2022) Compounds in cigarette smoke induce EGR1 expression via the AHR, resulting in apoptosis and COPD. *Journal of Biochemistry* vol. 172, n° 6, p. 365-376. [<https://doi.org/10.1093/jb/mvac077>]
- HAVARINASAB, S., HÄGGQVIST, B., BJÖRN, E., *et al.* (2005) Immunosuppressive and autoimmune effects of thimerosal in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* vol. 204, n° 2, p. 109-121. [<https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.08.019>]
- HAVARINASAB, S., HULTMAN, P. (2005) Organic mercury compounds and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* vol. 4, n° 5, p. 270-275. [<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2004.12.001>]
- HE, Z.L., YANG, X.E., STOFFELLA, P.J. (2005) Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* vol. 19, n° 2, p. 125-140. [<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.010>]
- HEINRICH, P.C., BEHRMANN, I., HAAN, S., *et al.* (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical Journal* vol. 374, n° Pt 1, p. 1-20. [<https://doi.org/10.1042/BJ20030407>]
- HEO, Y., PARSONS, P.J., LAWRENCE, D.A. (1996) Lead Differentially Modifies Cytokine Production in Vitro and in Vivo. *Toxicology and Applied Pharmacology* vol. 138, n° 1, p. 149-157. [<https://doi.org/10.1006/taap.1996.0108>]
- HEW, K.M., WALKER, A.I., KOHLI, A., *et al.* (2015) Childhood exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbons is linked to epigenetic modifications and impaired systemic immunity in T cells. *Clinical & Experimental Allergy* vol. 45, n° 1, p. 238-248. [<https://doi.org/10.1111/cea.12377>]
- HIDAKA, T., OGAWA, E., KOBAYASHI, E.H., *et al.* (2017) The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of the neurotrophic factor artemin. *Nature Immunology* vol. 18, n° 1, p. 64-73. [<https://doi.org/10.1038/ni.3614>]
- HIGHAM, A., BOSTOCK, D., BOOTH, G., *et al.* (2018) The effect of electronic cigarette and tobacco smoke exposure on COPD bronchial epithelial cell inflammatory responses. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* vol. 13, p. 989-1000. [<https://doi.org/10.2147/COPD.S157728>]
- HIGHAM, A., RATTRAY, N.J.W., DEWHURST, J.A., *et al.* (2016) Electronic cigarette exposure triggers neutrophil inflammatory responses. *Respiratory Research* vol. 17, n° 1, p. 56. [<https://doi.org/10.1186/s12931-016-0368-x>]
- HIRT, N., BODY-MALAPEL, M. (2020) Immunotoxicity and intestinal effects of nano- and microplastics: a review of the literature. *Particle and Fibre Toxicology* vol. 17, p. 57. [<https://doi.org/10.1186/s12989-020-00387-7>]
- HOLMES, L.A., TURNER, A., THOMPSON, R.C. (2012) Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment. *Environmental Pollution* vol. 160, p. 42-48. [<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.08.052>]
- HOPPIN, J.A., UMBACH, D.M., LONDON, S.J., *et al.* (2009) Pesticide use and adult-onset asthma among male farmers in the Agricultural Health Study. *European Respiratory Journal* vol. 34, n° 6, p. 1296-1303. [<https://doi.org/10.1183/09031936.00005509>]
- HOTCHKISS, J.A., HARKEMA, J.R., SUN, J.D., *et al.* (1989) Comparison of acute ozone-induced nasal and pulmonary inflammatory responses in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* vol. 98, n° 2, p. 289-302. [[https://doi.org/10.1016/0041-008X\(89\)90234-2](https://doi.org/10.1016/0041-008X(89)90234-2)]
- HU, J., QIN, X., ZHANG, J., *et al.* (2021) Polystyrene microplastics disturb maternal-fetal immune balance and cause reproductive toxicity in pregnant mice. *Reproductive Toxicology* vol. 106, p. 42-50. [<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2021.10.002>]
- HULTMAN, P., BELL, L.J., ENESTRÖM, S., *et al.* (1992) Murine susceptibility to mercury: I. Autoantibody profiles and systemic immune deposits in inbred, congenic, and intra-H-2 recombinant strains. *Clinical Immunology and Immunopathology* vol. 65, n° 2, p. 98-109. [[https://doi.org/10.1016/0090-1229\(92\)90212-7](https://doi.org/10.1016/0090-1229(92)90212-7)]

- HURTEAU, M.D., WESTERLING, A.L., WIEDINMYER, C., *et al.* (2014) Projected Effects of Climate and Development on California Wildfire Emissions through 2100. *Environmental Science & Technology* vol. 48, n° 4, p. 2298-2304. [<https://doi.org/10.1021/es4050133>]
- HWANG, J.H., LYES, M., SLADEWSKI, K., *et al.* (2016) Electronic cigarette inhalation alters innate immunity and airway cytokines while increasing the virulence of colonizing bacteria. *Journal of Molecular Medicine* vol. 94, n° 6, p. 667-679. [<https://doi.org/10.1007/s00109-016-1378-3>]
- INSTITUT FÜR BIOLOGISCHE FORSCHUNG, BECKER, D., GERSTENBERG, B.; PRUHS, D.; ROMER, E.; TEREDESAI, A.; TEWES, F.; WALK, R.A. (1986) Report P 0500 / 3113 21-Day inhalation study with mainstream and sidestream smoke of standard reference cigarette 2R1 on rats TPM concentration, volume 1. In *University of California San Francisco*. [<https://www.industrydocuments.ucsf.edu/tobacco/docs/#id=mhnl0086>] (consulté le 11/04/2023).
- INSTITUT FÜR BIOLOGISCHE FORSCHUNG, BECKER, D., ROMER, E.; SCHNELL, P.; SPECK, M.; TEREDESAI, A.; TEWES, F.; WALK, R.A. (1985a) Report A 0500/3081 21 - Day smoke inhalation study with mainstream and sidestream smoke of standard reference cigarette 2R1 on rats sister chromatid exchange and chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes and pulmonary macrophages. In *University of California San Francisco*. [<https://www.industrydocuments.ucsf.edu/tobacco/docs/#id=qhfl0124>] (consulté le 11/04/2023).
- INSTITUT FÜR BIOLOGISCHE FORSCHUNG, HACKENBERG, U., KINDT, R.; PRUHS, D.; ROMER, E.; TEREDESAI, A.; TEWES, F.; WALK, R. (1985b) Report P 0500/3108 21-Day inhalation study with mainstream and sidestream smoke of standard reference cigarette 2R1 on rats phagocytic activity of free lung cells. In *University of California San Francisco*. [<https://www.industrydocuments.ucsf.edu/tobacco/docs/#id=sgwl0086>] (consulté le 11/04/2023).
- IWATA, M., ESHIMA, Y., KAGECHIKA, H., *et al.* (2004) The endocrine disruptors nonylphenol and octylphenol exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development. *Immunology Letters* vol. 94, n° 1, p. 135-139. [<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.04.013>]
- JAAKKOLA, M.S., JAAKKOLA, J.J. (1997) Assessment of exposure to environmental tobacco smoke. *European Respiratory Journal* vol. 10, n° 10, p. 2384-2397. [<https://doi.org/10.1183/09031936.97.10102384>]
- JAMBECK, J.R., GEYER, R., WILCOX, C., *et al.* (2015) Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* vol. 347, n° 6223, p. 768-771. [<https://doi.org/10.1126/science.1260352>]
- JAMESON, S.C., MASOPUST, D. (2018) Understanding subset diversity in T cell memory. *Immunity* vol. 48, n° 2, p. 214-226. [<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.02.010>]
- JÄRUP, L. (2003) Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* vol. 68, n° 1, p. 167-182. [<https://doi.org/10.1093/bmb/ldg032>]
- JIA, X., WANG, D., GAO, N., *et al.* (2015) Atrazine Triggers the Extrinsic Apoptosis Pathway in Lymphocytes of the Frog *Pelophylax nigromaculata* in Vivo. *Chemical Research in Toxicology* vol. 28, n° 10, p. 2010-2018. [<https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00238>]
- JIN, Y., LIU, L., ZHANG, S., *et al.* (2016) Cadmium exposure to murine macrophages decreases their inflammatory responses and increases their oxidative stress. *Chemosphere* vol. 144, p. 168-175. [<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.084>]
- JIN, Y., XIA, J., PAN, Z., *et al.* (2018) Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish. *Environmental Pollution* vol. 235, p. 322-329. [<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.088>]

- JOHANSSON, U., HANSSON-GEORGIADIS, H., HULTMAN, P. (1998) The Genotype Determines the B Cell Response in Mercury–Treated Mice. *International Archives of Allergy and Immunology* vol. 116, n° 4, p. 295-305. [https://doi.org/10.1159/000023959]
- KA, D. (2011) Étude de l'association entre tabagisme passif et présence de dermatoses d'origine allergique chez le chien. Thèse de médecine vétérinaire. Maisons-Alfort, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.
- KAPLAN, B.L.F., CRAWFORD, R.B., KOVALOVA, N., *et al.* (2011) TCDD adsorbed on silica as a model for TCDD contaminated soils: Evidence for suppression of humoral immunity in mice. *Toxicology* vol. 282, n° 3, p. 82-87. [https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.01.013]
- KARAGAS, M.R., STUKEL, T.A., MORRIS, J.S., *et al.* (2001) Skin Cancer Risk in Relation to Toenail Arsenic Concentrations in a US Population-based Case-Control Study. *American Journal of Epidemiology* vol. 153, n° 6, p. 559-565. [https://doi.org/10.1093/aje/153.6.559]
- KARAGAS, M.R., TOSTESON, T.D., MORRIS, J.S., *et al.* (2004) Incidence of Transitional Cell Carcinoma of the Bladder and Arsenic Exposure in New Hampshire. *Cancer Causes & Control* vol. 15, n° 5, p. 465-472. [https://doi.org/10.1023/B:CACO.0000036452.55199.a3]
- KARROW, N.A., MCCAY, J.A., BROWN, R.D., *et al.* (2005) Oral exposure to atrazine modulates cell-mediated immune function and decreases host resistance to the B16F10 tumor model in female B6C3F1 mice. *Toxicology* vol. 209, n° 1, p. 15-28. [https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.12.002]
- KASSAMBARA, A. (2018) Test de Wilcoxon dans R: Excellente Référence. *Datanovia*. [https://www.datanovia.com/en/fr/lessons/test-de-wilcoxon-dans-r/] (consulté le 17/07/2023).
- KASSOTIS, C.D., IWANOWICZ, L.R., AKOB, D.M., *et al.* (2016) Endocrine disrupting activities of surface water associated with a West Virginia oil and gas industry wastewater disposal site. *Science of The Total Environment* vol. 557-558, p. 901-910. [https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.113]
- KENNEDY, S.N., KEOGH, M., LEVIN, M., *et al.* (2021) Regional variations and relationships among cytokine profiles, white blood cell counts, and blood mercury concentrations in Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*) pups. *Science of The Total Environment* vol. 775, p. 144894. [https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144894]
- KERKVLJET, N.I. (1995) Immunological effects of chlorinated dibenzo-p-dioxins. *Environmental Health Perspectives* vol. 103, n° suppl 9, p. 47-53. [https://doi.org/10.1289/ehp.95103s947]
- KHACHATOORIAN, C., III, P.J., BENOWITZ, N.L., *et al.* (2019) Electronic cigarette chemicals transfer from a vape shop to a nearby business in a multiple-tenant retail building. *Tobacco Control* vol. 28, n° 5, p. 519-525. [https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2018-054316]
- KHAN, S., MALIK, A. (2018) Toxicity evaluation of textile effluents and role of native soil bacterium in biodegradation of a textile dye. *Environmental Science and Pollution Research* vol. 25, n° 5, p. 4446-4458. [https://doi.org/10.1007/s11356-017-0783-7]
- KIM, A., PARK, S., SUNG, J.H. (2020) Cell Viability and Immune Response to Low Concentrations of Nickel and Cadmium: An In Vitro Model. *International Journal of Environmental Research and Public Health* vol. 17, n° 24, p. 9218. [https://doi.org/10.3390/ijerph17249218]
- KIM, S. (2016) Overview of Cotinine Cutoff Values for Smoking Status Classification. *International Journal of Environmental Research and Public Health* vol. 13, n° 12, p. 1236. [https://doi.org/10.3390/ijerph13121236]
- KING, T.E., Jr., SAVICI, D., CAMPBELL, P.A. (1988) Phagocytosis and Killing of *Listeria monocytogenes* by Alveolar Macrophages: Smokers Versus Nonsmokers. *The Journal of Infectious Diseases* vol. 158, n° 6, p. 1309-1316. [https://doi.org/10.1093/infdis/158.6.1309]
- KNOWLES, S.O., DONALDSON, W.E. (1997) Lead disrupts eicosanoid metabolism, macrophage function, and disease resistance in birds. *Biological Trace Element Research* vol. 60, n° 1, p. 13-26. [https://doi.org/10.1007/BF02783306]

- KODIROV, S.A. (2017) Addictive neurons. *Therapeutic Targets for Neurological Diseases* vol. 4, p. e1498. [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5479441/pdf/nihms864428.pdf>]
- KOLAHIAN, S., SHAHBAZFAR, A.A., TAYEFI-NASRABADI, H., *et al.* (2014) Tiotropium effects on airway inflammatory events in the cat as an animal model for acute cigarette smoke-induced lung inflammation. *Experimental Lung Research* vol. 40, n° 6, p. 272-287. [<https://doi.org/10.3109/01902148.2014.905657>]
- KOWOLENKO, M., TRACY, L., LAWRENCE, D. (1991) Early effects of lead on bone marrow cell responsiveness in mice challenged with *Listeria monocytogenes*. *Fundamental and Applied Toxicology* vol. 17, n° 1, p. 75-82. [[https://doi.org/10.1016/0272-0590\(91\)90240-5](https://doi.org/10.1016/0272-0590(91)90240-5)]
- KUIPER, G.G.J.M., LEMMEN, J.G., CARLSSON, B., *et al.* (1998) Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β . *Endocrinology* vol. 139, n° 10, p. 4252-4263. [<https://doi.org/10.1210/endo.139.10.6216>]
- KULAS, J., NINKOV, M., TUCOVIC, D., *et al.* (2019) Subchronic Oral Cadmium Exposure Exerts both Stimulatory and Suppressive Effects on Pulmonary Inflammation/Immune Reactivity in Rats. *Biomedical and Environmental Sciences* vol. 32, n° 7, p. 508-519. [<https://doi.org/10.3967/bes2019.068>]
- KÜNZLI, N., KAISER, R., MEDINA, S., *et al.* (2000) Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment. *The Lancet* vol. 356, n° 9232, p. 795-801. [[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02653-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02653-2)]
- LAIST, D.W. (1997) Impacts of Marine Debris: Entanglement of Marine Life in Marine Debris Including a Comprehensive List of Species with Entanglement and Ingestion Records. In Coe, J.M., Rogers, D.B. (Éd.), *Marine Debris: Sources, Impacts, and Solutions, Springer Series on Environmental Management*. New York, Springer, p. 99-139. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8486-1_10]
- LANDRIGAN, P.J., FULLER, R., ACOSTA, N.J.R., *et al.* (2018) The Lancet Commission on pollution and health. *The Lancet* vol. 391, n° 10119, p. 462-512. [[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32345-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32345-0)]
- LASSELIN, J., ALVAREZ-SALAS, E., GRIGOLEIT, J.-S. (2016) Well-being and immune response: a multi-system perspective. *Current Opinion in Pharmacology, Cancer • Immunomodulation* vol. 29, p. 34-41. [<https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.05.003>]
- LEE, E.-J., JANG, Y., KANG, K., *et al.* (2016) Atrazine induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of T lymphocytes via the caspase-8-dependent pathway. *Environmental Toxicology* vol. 31, n° 8, p. 998-1008. [<https://doi.org/10.1002/tox.22109>]
- LEE, G.-H., CHOI, K.-C. (2020) Adverse effects of pesticides on the functions of immune system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* vol. 235, p. 108789. [<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108789>]
- LEE, G.R. (2018) The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19, n° 3, p. 730. [<https://doi.org/10.3390/ijms19030730>]
- LEE, J.-E., CHEN, S., GOLEMBOSKI, K.A., *et al.* (2001) Developmental windows of differential lead-induced immunotoxicity in chickens. *Toxicology* vol. 156, n° 2, p. 161-170. [[https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00350-4](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00350-4)]
- LEE, J.-E., DIETERT, R.R. (2003) Developmental immunotoxicity of lead: Impact on thymic function. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* vol. 67, n° 10, p. 861-867. [<https://doi.org/10.1002/bdra.10092>]
- LEE, M.H., CHUNG, S.W., KANG, B.Y., *et al.* (2003) Enhanced interleukin-4 production in CD4+ T cells and elevated immunoglobulin E levels in antigen-primed mice by bisphenol A and nonylphenol, endocrine disruptors: involvement of nuclear factor-AT and Ca²⁺. *Immunology* vol. 109, n° 1, p. 76-86. [<https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01631.x>]
- LEE, M.H., CHUNG, S.W., KANG, B.Y., *et al.* (2002) Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, enhances interleukin-4 production in CD4+ T cells and increases immunoglobulin

- E levels in antigen-primed mice. *Immunology* vol. 106, n° 4, p. 496-502. [https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01451.x]
- LEHNERT, K., SIEBERT, U., REISSMANN, K., *et al.* (2019) Cytokine expression and lymphocyte proliferative capacity in diseased harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) – Biomarkers for health assessment in wildlife cetaceans. *Environmental Pollution* vol. 247, p. 783-791. [https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.079]
- LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., *et al.* (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* vol. 86, n° 6, p. 973-983. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80172-5]
- LERNER, C.A., SUNDAR, I.K., YAO, H., *et al.* (2015) Vapors Produced by Electronic Cigarettes and E-Juices with Flavorings Induce Toxicity, Oxidative Stress, and Inflammatory Response in Lung Epithelial Cells and in Mouse Lung. *PLoS One* vol. 10, n° 2, p. e0116732. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116732]
- LI, B., DING, Y., CHENG, X., *et al.* (2020) Polyethylene microplastics affect the distribution of gut microbiota and inflammation development in mice. *Chemosphere* vol. 244, p. 125492. [https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125492]
- LI, Q., NAKADAI, A., TAKEDA, K., *et al.* (2004) Dimethyl 2,2-dichlorovinyl phosphate (DDVP) markedly inhibits activities of natural killer cells, cytotoxic T lymphocytes and lymphokine-activated killer cells via the Fas-ligand/Fas pathway in perforin-knockout (PKO) mice. *Toxicology* vol. 204, n° 1, p. 41-50. [https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.05.019]
- LI, X., LI, N., HAN, Y., *et al.* (2021) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced suppression of immunity in THP-1-derived macrophages and the possible mechanisms. *Environmental Pollution* vol. 287, p. 117302. [https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117302]
- LI, Y., XU, M., ZHANG, Z., *et al.* (2022) In vitro study on the toxicity of nanoplastics with different charges to murine splenic lymphocytes. *Journal of Hazardous Materials* vol. 424, p. 127508. [https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127508]
- LIM, H.B., KIM, S.H. (2014) Inhalation of e-Cigarette Cartridge Solution Aggravates Allergen-induced Airway Inflammation and Hyper-responsiveness in Mice. *Toxicological Research* vol. 30, n° 1, p. 13-18. [https://doi.org/10.5487/TR.2014.30.1.013]
- LIM, S.S., VOS, T., FLAXMAN, A.D., *et al.* (2012) A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* vol. 380, n° 9859, p. 2224-2260. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61766-8]
- LIU, J., WANG, Y., ZHAO, H., *et al.* (2020) Arsenic (III) or/and copper (II) exposure induce immunotoxicity through trigger oxidative stress, inflammation and immune imbalance in the bursa of chicken. *Ecotoxicology and Environmental Safety* vol. 190, p. 110127. [https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110127]
- LIU, J., ZHAO, H., WANG, Y., *et al.* (2018) Impacts of simultaneous exposure to arsenic (III) and copper (II) on inflammatory response, immune homeostasis, and heat shock response in chicken thymus. *International Immunopharmacology* vol. 64, p. 60-68. [https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.08.021]
- LODOVICI, M., AKPAN, V., EVANGELISTI, C., *et al.* (2004) Sidestream tobacco smoke as the main predictor of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Applied Toxicology* vol. 24, n° 4, p. 277-281. [https://doi.org/10.1002/jat.992]
- LUCONI, M., BONACCORSI, L., FORTI, G., *et al.* (2001) Effects of estrogenic compounds on human spermatozoa: evidence for interaction with a nongenomic receptor for estrogen on human sperm membrane. *Molecular and Cellular Endocrinology* vol. 178, n° 1, p. 39-45. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00416-6]

- MACEY, G.P., BREECH, R., CHERNAIK, M., *et al.* (2014) Air concentrations of volatile compounds near oil and gas production: a community-based exploratory study. *Environmental Health* vol. 13, n° 1, p. 82. [https://doi.org/10.1186/1476-069X-13-82]
- MADISON, M.C., LANDERS, C.T., GU, B.-H., *et al.* (2019) Electronic cigarettes disrupt lung lipid homeostasis and innate immunity independent of nicotine. *The Journal of Clinical Investigation* vol. 129, n° 10, p. 4290-4304. [https://doi.org/10.1172/JCI128531]
- MAGGINI, S., WINTERGERST, E.S., BEVERIDGE, S., *et al.* (2007) Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. *British Journal of Nutrition* vol. 98, n° S1, p. S29-S35. [https://doi.org/10.1017/S0007114507832971]
- MÄKELÄ, O., ROUSLAHTI, E., SEPPÄLÄ, I.J.T. (1970) Affinity of IgM and IgG antibodies. *Immunochemistry* vol. 7, n° 11, p. 917-932. [https://doi.org/10.1016/0019-2791(70)90053-4]
- MARTH, E., JELOVCAN, S., KLEINHAPPL, B., *et al.* (2001) The effect of heavy metals on the immune system at low concentrations. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* vol. 14, n° 4, p. 375-386.
- MARTIN, M.W., NEWCOMB, J., NUNES, J.J., *et al.* (2006) Novel 2-Aminopyrimidine Carbamates as Potent and Orally Active Inhibitors of Lck: Synthesis, SAR, and in Vivo Antiinflammatory Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* vol. 49, n° 16, p. 4981-4991. [https://doi.org/10.1021/jm060435i]
- MÁSDÓTTIR, B., JÓNSSON, T., MANFREDSDÓTTIR, V., *et al.* (2000) Smoking, rheumatoid factor isotypes and severity of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* vol. 39, n° 11, p. 1202-1205. [https://doi.org/10.1093/rheumatology/39.11.1202]
- MATHEWS, J.D., WHITTINGHAM, S., HOOPER, B.M., *et al.* (1973) Association of autoantibodies with smoking, cardiovascular morbidity, and death in the Busselton population. *The Lancet* vol. 302, n° 7832, p. 754-758. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736(73)91037-4]
- MCAULEY, T.R., HOPKE, P.K., ZHAO, J., *et al.* (2012) Comparison of the effects of e-cigarette vapor and cigarette smoke on indoor air quality. *Inhalation Toxicology* vol. 24, n° 12, p. 850-857. [https://doi.org/10.3109/08958378.2012.724728]
- MCCABE, M.J., LAWRENCE, D.A. (1991) Lead, a major environmental pollutant, is immunomodulatory by its differential effects on CD4+ T cell subsets. *Toxicology and Applied Pharmacology* vol. 111, n° 1, p. 13-23. [https://doi.org/10.1016/0041-008X(91)90129-3]
- MCCREA, K.A., ENSOR, J.E., NALL, K., *et al.* (1994) Altered cytokine regulation in the lungs of cigarette smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* vol. 150, n° 3, p. 696-703. [https://doi.org/10.1164/ajrccm.150.3.8087340]
- MEDINA, S., LAUER, F.T., CASTILLO, E.F., *et al.* (2020) Exposures to uranium and arsenic alter intraepithelial and innate immune cells in the small intestine of male and female mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* vol. 403, p. 115155. [https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115155]
- MENG, Y., WANG, K., WANG, T., *et al.* (2021) Early occupational exposure to lead on neutrophil-to-lymphocyte ratio and genotoxicity. *Environment International* vol. 151, p. 106448. [https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106448]
- MILLER, T.E., GOLEMBOSKI, K.A., HA, R.S., *et al.* (1998) Developmental Exposure to Lead Causes Persistent Immunotoxicity in Fischer 344 Rats. *Toxicological Sciences* vol. 42, n° 2, p. 129-135. [https://doi.org/10.1006/toxs.1998.2424]
- MIRKOV, I., POPOV ALEKSANDROV, A., NINKOV, M., *et al.* (2021) Immunotoxicology of cadmium: Cells of the immune system as targets and effectors of cadmium toxicity. *Food and Chemical Toxicology* vol. 149, p. 112026. [https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112026]

- MOESER, A.J., POHL, C.S., RAJPUT, M. (2017) Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. *Animal Nutrition* vol. 3, n° 4, p. 313-321. [<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.003>]
- MOETUS, A. (2019) Effet du stress sur le système immunitaire des chiens d'utilité. Thèse de médecine vétérinaire. Maisons-Alfort, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.
- MORRIS, D.L., KARRAS, J.G., HOLSAPPLE, M.P. (1993) Direct effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on responses to lipopolysaccharide (LPS) by isolated murine B-cells. *Immunopharmacology* vol. 26, n° 2, p. 105-112. [[https://doi.org/10.1016/0162-3109\(93\)90002-8](https://doi.org/10.1016/0162-3109(93)90002-8)]
- MORZADEC, C., BOUEZZEDINE, F., MACOCH, M., *et al.* (2012) Inorganic arsenic impairs proliferation and cytokine expression in human primary T lymphocytes. *Toxicology* vol. 300, n° 1, p. 46-56. [<https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.05.025>]
- MOS, L., MORSEY, B., JEFFRIES, S.J., *et al.* (2006) Chemical and biological pollution contribute to the immunological profiles of free-ranging harbor seals. *Environmental Toxicology and Chemistry* vol. 25, n° 12, p. 3110-3117. [<https://doi.org/10.1897/06-027R.1>]
- MYBIOSOURCE (2021) Canine Cotinine ELISA Kit Manual. [<https://www.mybiosource.com/canine-elisa-kits/cotinine/2614389>] (consulté le 09/09/2023).
- NAEHER, L.P., BRAUER, M., LIPSETT, M., *et al.* (2007) Woodsmoke Health Effects: A Review. *Inhalation Toxicology* vol. 19, n° 1, p. 67-106. [<https://doi.org/10.1080/08958370600985875>]
- NAGARKATTI, P.S., SWEENEY, G.D., GAULDIE, J., *et al.* (1984) Sensitivity to suppression of cytotoxic T cell generation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) is dependent on the Ah genotype of the murine host. *Toxicology and Applied Pharmacology* vol. 72, n° 1, p. 169-176. [[https://doi.org/10.1016/0041-008X\(84\)90261-8](https://doi.org/10.1016/0041-008X(84)90261-8)]
- NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION (2023) What are microplastics? *In National Ocean Service Website*. [<https://oceanservice.noaa.gov/facts/microplastics.html>] (consulté le 04/04/2023).
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (1986) NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of C.I. Basic Red 9 Monohydrochloride (Pararosaniline) (CAS No. 569-61-9) In F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). *National Toxicology Program Technical Report Series* vol. 285, p. 1-228.
- NAYIR, E., KARACABEY, B., KIRCA, O., *et al.* (2016) Electronic cigarette (e-cigarette). *Journal of Oncological Science* vol. 2, n° 1, p. 16-20. [<https://doi.org/10.1016/j.jons.2016.04.001>]
- NIZRI, E., IRONY-TUR-SINAI, M., LORY, O., *et al.* (2009) Activation of the Cholinergic Anti-Inflammatory System by Nicotine Attenuates Neuroinflammation via Suppression of Th1 and Th17 Responses. *The Journal of Immunology* vol. 183, n° 10, p. 6681-6688. [<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902212>]
- NORDSTROM, D.K. (2002) Worldwide Occurrences of Arsenic in Ground Water. *Science* vol. 296, n° 5576, p. 2143-2145. [<https://doi.org/10.1126/science.1072375>]
- NOWORYTA-GLOWACKA, J., BERESINSKA, M., BANKOWSKI, R., *et al.* (2014) Effect of chlorpyrifos on the profile of subpopulations immunocompetent cells B, T and NK in in vivo model. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* vol. 65, n° 4, p. 311-316.
- OGBEIDE, O., TONGO, I., EZEMONYE, L. (2015) Risk assessment of agricultural pesticides in water, sediment, and fish from Owan River, Edo State, Nigeria. *Environmental Monitoring and Assessment* vol. 187, n° 10, p. 654. [<https://doi.org/10.1007/s10661-015-4840-8>]
- OMS (2022) Tabac. *In Organisation mondiale de la santé*. [<https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>] (consulté le 15/07/2023).
- ONG, C.B., KUMAGAI, K., BROOKS, P.T., *et al.* (2016) Ozone-Induced Type 2 Immunity in Nasal Airways. Development and Lymphoid Cell Dependence in Mice. *American Journal of*

- Respiratory Cell and Molecular Biology* vol. 54, n° 3, p. 331-340. [https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0165OC]
- OSBORN, S.G., VENGOSE, A., WARNER, N.R., *et al.* (2011) Methane contamination of drinking water accompanying gas-well drilling and hydraulic fracturing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* vol. 108, n° 20, p. 8172-8176. [https://doi.org/10.1073/pnas.1100682108]
- PABIS, K., GUNDAKER, C., GIACCONI, R., *et al.* (2018) Zinc supplementation can reduce accumulation of cadmium in aged metallothionein transgenic mice. *Chemosphere* vol. 211, p. 855-860. [https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.017]
- PADALINO, B., RAIDAL, S.L., CARTER, N., *et al.* (2017) Immunological, clinical, haematological and oxidative responses to long distance transportation in horses. *Research in Veterinary Science* vol. 115, p. 78-87. [https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.01.024]
- PARK, E.-J., HAN, J.-S., SEONG, E., *et al.* (2020) Repeated-oral dose toxicity of polyethylene microplastics and the possible implications on reproduction and development of the next generation. *Toxicology Letters* vol. 324, p. 75-85. [https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.01.008]
- PARK, S.S., KIKKAWA, Y., GOLDRING, I.P., *et al.* (1977) An animal model of cigarette smoking in beagle dogs: correlative evaluation of effects on pulmonary function, defense, and morphology. *The American Review of Respiratory Disease* vol. 115, n° 6, p. 971-979. [https://doi.org/10.1164/arrd.1977.115.6.971]
- PARKIN, J., COHEN, B. (2001) An overview of the immune system. *The Lancet* vol. 357, n° 9270, p. 1777-1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7]
- PARYS, M., BAVCAR, S., MELLANBY, R.J., *et al.* (2023) Use of multi-color flow cytometry for canine immune cell characterization in cancer. *PLoS One* vol. 18, n° 3, p. e0279057. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279057]
- PASQUEREAU, A., ANDLER, R., GUIGNARD, R., *et al.* (2022) Prévalence nationale et régionale du tabagisme en France en 2021 parmi les 18-75 ans. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire* n° 26, p. 470-80. [https://www.santepubliquefrance.fr/content/download/498976/3737702?version=1]
- PATHAK, N., KHANDELWAL, S. (2008) Impact of cadmium in T lymphocyte subsets and cytokine expression: differential regulation by oxidative stress and apoptosis. *BioMetals* vol. 21, n° 2, p. 179-187. [https://doi.org/10.1007/s10534-007-9106-7]
- PHILIBERT, R.A., BEACH, S.R.H., BRODY, G.H. (2012) Demethylation of the aryl hydrocarbon receptor repressor as a biomarker for nascent smokers. *Epigenetics* vol. 7, n° 11, p. 1331-1338. [https://doi.org/10.4161/epi.22520]
- PINCHUK, L.M., LEE, S.-R., FILIPOV, N.M. (2007) In vitro atrazine exposure affects the phenotypic and functional maturation of dendritic cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* vol. 223, n° 3, p. 206-217. [https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.06.004]
- PINEDA-ZAVALA, A.P., GARCÍA-VARGAS, G., BORJA-ABURTO, V.H., *et al.* (2004) Nitric oxide and superoxide anion production in monocytes from children exposed to arsenic and lead in region Lagunera, Mexico. *Toxicology and Applied Pharmacology* vol. 198, n° 3, p. 283-290. [https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.10.034]
- POCINO, M., MALAVÉ, I., BAUTE, L. (1990) Zinc Administration Restores the Impaired Immune Response Observed in Mice Receiving Excess Copper by Oral Route. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* vol. 12, n° 4, p. 697-713. [https://doi.org/10.3109/08923979009019685]
- PODECHARD, N., LECUREUR, V., LE FERREC, E., *et al.* (2008) Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicology Letters* vol. 177, n° 2, p. 130-137. [https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.01.006]

- POLLARD, K.M., CAUVI, D.M., TOOMEY, C.B., *et al.* (2019) Mercury-induced inflammation and autoimmunity. *Biochimica et Biophysica Acta* vol. 1863, n° 12, p. 129299. [https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.02.001]
- POLTORAK, A., HE, X., SMIRNOVA, I., *et al.* (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* vol. 282, n° 5396, p. 2085-2088. [https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2085]
- PRADHAN, A., BAGCHI, A., DE, S., *et al.* (2019) Role of redox imbalance and cytokines in mediating oxidative damage and disease progression of patients with rheumatoid arthritis. *Free Radical Research* vol. 53, n° 7, p. 768-779. [https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1629586]
- QUINTANA, F.J., BASSO, A.S., IGLESIAS, A.H., *et al.* (2008) Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* vol. 453, n° 7191, p. 65-71. [https://doi.org/10.1038/nature06880]
- R CORE TEAM (2022) R: A language and environment for statistical computing. *In R Foundation for Statistical Computing*. [https://www.r-project.org/] (consulté le 22/08/2023).
- RAO, S.P., SIKORA, L., HOSSEINKHANI, M.R., *et al.* (2009) Exposure to environmental tobacco smoke induces angiogenesis and leukocyte trafficking in lung microvessels. *Experimental Lung Research* vol. 35, n° 2, p. 119-135. [https://doi.org/10.1080/01902140802449729]
- REIF, J.S., COHEN, D. (1970) Canine pulmonary disease. II. Retrospective radiographic analysis of pulmonary disease in rural and urban dogs. *Archives of Environmental Health* vol. 20, n° 6, p. 684-689. [https://doi.org/10.1080/00039896.1970.10665644]
- REIF, J.S., DUNN, K., OGILVIE, G.K., *et al.* (1992) Passive Smoking and Canine Lung Cancer Risk. *American Journal of Epidemiology* vol. 135, n° 3, p. 234-239. [https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a116276]
- RIONDATO, F., COMAZZI, S. (2021) Flow Cytometry in the Diagnosis of Canine B-Cell Lymphoma. *Frontiers in Veterinary Science* vol. 8, p. 600986. [https://doi.org/10.3389/fvets.2021.600986]
- RIOS, L.M., MOORE, C., JONES, P.R. (2007) Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. *Marine Pollution Bulletin* vol. 54, n° 8, p. 1230-1237. [https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.03.022]
- RIVAS-ARANCIBIA, S., HERNÁNDEZ-OROZCO, E., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, E., *et al.* (2022) Ozone Pollution, Oxidative Stress, Regulatory T Cells and Antioxidants. *Antioxidants* vol. 11, n° 8, p. 1553. [https://doi.org/10.3390/antiox11081553]
- ROBERT, J., MCGUIRE, C.C., KIM, F., *et al.* (2018) Water Contaminants Associated With Unconventional Oil and Gas Extraction Cause Immunotoxicity to Amphibian Tadpoles. *Toxicological Sciences* vol. 166, n° 1, p. 39-50. [https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy179]
- ROBERT, J., MCGUIRE, C.C., NAGEL, S., *et al.* (2019) Developmental exposure to chemicals associated with unconventional oil and gas extraction alters immune homeostasis and viral immunity of the amphibian *Xenopus*. *Science of The Total Environment* vol. 671, p. 644-654. [https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.395]
- ROCHMAN, C.M., HENTSCHEL, B.T., TEH, S.J. (2014) Long-Term Sorption of Metals Is Similar among Plastic Types: Implications for Plastic Debris in Aquatic Environments. *PLoS One* vol. 9, n° 1, p. e85433. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085433]
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, E., MARTÍNEZ, F., ESPINOSA-GARCÍA, M.T., *et al.* (2013) Mitochondrial dysfunction in the hippocampus of rats caused by chronic oxidative stress. *Neuroscience* vol. 252, p. 384-395. [https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.018]
- ROGERS, S., DE SOUZA, A.R., ZAGO, M., *et al.* (2017) Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependent regulation of pulmonary miRNA by chronic cigarette smoke exposure. *Scientific Reports* vol. 7, p. 40539. [https://doi.org/10.1038/srep40539]

- ROMANI, N., CLAUSEN, B.E., STOITZNER, P. (2010) Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunological Reviews* vol. 234, n° 1, p. 120-141. [<https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00886.x>]
- ROSA, P. de la, BARNETT, J.B., SCHAFER, R. (2005) Characterization Of Thymic Atrophy and the Mechanism of Thymocyte Depletion after in Vivo Exposure to a Mixture Of Herbicides. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* vol. 68, n° 2, p. 81-98. [<https://doi.org/10.1080/15287390590886072>]
- ROSS, P., DE SWART, R., ADDISON, R., *et al.* (1996) Contaminant-induced immunotoxicity in harbour seals: Wildlife at risk? *Toxicology* vol. 112, n° 2, p. 157-169. [[https://doi.org/10.1016/0300-483X\(96\)03396-3](https://doi.org/10.1016/0300-483X(96)03396-3)]
- ROWAN, E.L., KRAEMER, T.F. (2012) Radon-222 Content of natural gas samples from Upper and Middle Devonian sandstone and shale reservoirs in Pennsylvania. *U.S. Geological Survey Open-File Report* n° 1159, p. 6. [<https://pubs.usgs.gov/of/2012/1159/ofr2012-1159.pdf>]
- ROWE, A.M., BRUNDAGE, K.M., BARNETT, J.B. (2007) In vitro atrazine-exposure inhibits human natural killer cell lytic granule release. *Toxicology and Applied Pharmacology* vol. 221, n° 2, p. 179-188. [<https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.01.012>]
- SANDBORN, W.J. (1999) Nicotine therapy for ulcerative colitis: a review of rationale, mechanisms, pharmacology, and clinical results. *The American Journal of Gastroenterology* vol. 94, n° 5, p. 1161-1171. [[https://doi.org/10.1016/S0002-9270\(99\)00115-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9270(99)00115-X)]
- SARASUA, S., VOGT, R., HENDERSON, O., *et al.* (2000) Serum Immunoglobulins and Lymphocyte Subset Distributions in Children and Adults Living in Communities Assessed for Lead and Cadmium Exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* vol. 60, n° 1, p. 1-15. [<https://doi.org/10.1080/009841000156556>]
- SARAVIA, J., YOU, D., THEVENOT, P., *et al.* (2014) Early-life exposure to combustion-derived particulate matter causes pulmonary immunosuppression. *Mucosal Immunology* vol. 7, n° 3, p. 694-704. [<https://doi.org/10.1038/mi.2013.88>]
- SATO, K.Z., FUJII, T., WATANABE, Y., *et al.* (1999) Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell lines. *Neuroscience Letters* vol. 266, n° 1, p. 17-20. [[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00259-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00259-1)]
- SCHEIERMANN, C., KUNISAKI, Y., FRENETTE, P.S. (2013) Circadian control of the immune system. *Nature reviews. Immunology* vol. 13, n° 3, p. 190-198. [<https://doi.org/10.1038/nri3386>]
- SCHICK, S., GLANTZ, S. (2005) Philip Morris toxicological experiments with fresh sidestream smoke: more toxic than mainstream smoke. *Tobacco Control* vol. 14, n° 6, p. 396-404. [<https://doi.org/10.1136/tc.2005.011288>]
- SHELLY, S., BOAZ, M., ORBACH, H. (2012) Prolactin and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, Special Issue on Gender, Sex Hormones, Pregnancy and Autoimmunity vol. 11, n° 6, p. A465-A470. [<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.11.009>]
- SHEN, Y.-H., PHAM, A.K., DAVIS, B., *et al.* (2016) Sex and strain-based inflammatory response to repeated tobacco smoke exposure in spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. *Inhalation Toxicology* vol. 28, n° 14, p. 677-685. [<https://doi.org/10.1080/08958378.2016.1249812>]
- SHENKER, B.J., BERTHOLD, P., ROONEY, C., *et al.* (1993) Immunotoxic Effects of Mercuric Compounds on Human Lymphocytes and Monocytes. III. Alterations in b-cell Function and Viability. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* vol. 15, n° 1, p. 87-112. [<https://doi.org/10.3109/08923979309066936>]
- SHENKER, B.J., ROONEY, C., VITALE, L., *et al.* (1992) Immunotoxic Effects of Mercuric Compounds on Human Lymphocytes and Monocytes. I. Suppression of T-Cell Activation.

- Immunopharmacology and Immunotoxicology* vol. 14, n° 3, p. 539-553. [https://doi.org/10.3109/08923979209005410]
- SINGH, A. (2019) Qu'est-ce que la fracturation hydraulique? *In Parlons sciences*. [https://parlonsscience.ca/ressources-pedagogiques/les-stim-en-contexte/quest-ce-que-la-fracturation-hydraulique] (consulté le 31/03/2023).
- SKARPHEDINSDOTTIR, H., GUNNARSSON, K., GUDMUNDSSON, G.A., *et al.* (2010) Bioaccumulation and Biomagnification of Organochlorines in a Marine Food Web at a Pristine Site in Iceland. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* vol. 58, n° 3, p. 800-809. [https://doi.org/10.1007/s00244-009-9376-x]
- SKRAJNOWSKA, D., BOBROWSKA-KORCZAK, B. (2019) Role of Zinc in Immune System and Anti-Cancer Defense Mechanisms. *Nutrients* vol. 11, n° 10, p. 2273. [https://doi.org/10.3390/nu11102273]
- SLAGER, R.E., SIMPSON, S.L., LEVAN, T.D., *et al.* (2010) Rhinitis Associated with Pesticide Use Among Private Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* vol. 73, n° 20, p. 1382-1393. [https://doi.org/10.1080/15287394.2010.497443]
- SNYDER, J.E., FILIPOV, N.M., PARSONS, P.J., *et al.* (2000) The Efficiency of Maternal Transfer of Lead and Its Influence on Plasma IgE and Splenic Cellularity of Mice. *Toxicological Sciences* vol. 57, n° 1, p. 87-94. [https://doi.org/10.1093/toxsci/57.1.87]
- SONNE, C., FONFARA, S., DIETZ, R., *et al.* (2007) Multiple Cytokine and Acute-Phase Protein Gene Transcription in West Greenland Sledge Dogs (*Canis familiaris*) Dietary Exposed to Organic Environmental Pollutants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* vol. 53, n° 1, p. 110-118. [https://doi.org/10.1007/s00244-006-0135-y]
- SOPORI, M.L., KOZAK, W., SAVAGE, S.M., *et al.* (1998) Nicotine-Induced Modulation of T Cell Function. *In* Friedman, H., Madden, J.J., Klein, T.W. (Éd.), *Drugs of Abuse, Immunomodulation, and Aids, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Boston, MA, Springer US, p. 279-289. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5347-2_31]
- SOTO-PEÑA, G.A., LUNA, A.L., ACOSTA-SAAVEDRA, L., *et al.* (2006) Assessment of lymphocyte subpopulations and cytokine secretion in children exposed to arsenic. *The FASEB Journal* vol. 20, n° 6, p. 779-781. [https://doi.org/10.1096/fj.05-4860fje]
- SPRIETSMA, J.E. (1997) Zinc-controlled Th1/Th2 switch significantly determines development of diseases. *Medical Hypotheses* vol. 49, n° 1, p. 1-14. [https://doi.org/10.1016/S0306-9877(97)90244-9]
- STADING, R., GASTELUM, G., CHU, C., *et al.* (2021) Molecular mechanisms of pulmonary carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Implications for human lung cancer. *Seminars in Cancer Biology* vol. 76, p. 3-16. [https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.07.001]
- STATES, J.C., SRIVASTAVA, S., CHEN, Y., *et al.* (2009) Arsenic and Cardiovascular Disease. *Toxicological Sciences* vol. 107, n° 2, p. 312-323. [https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn236]
- STOCKINGER, B., MEGLIO, P.D., GIALITAKIS, M., *et al.* (2014) The Aryl Hydrocarbon Receptor: Multitasking in the Immune System. *Annual Review of Immunology* vol. 32, n° 1, p. 403-432. [https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120245]
- STRICKLAND, F.M., LI, Y., JOHNSON, K., *et al.* (2015) CD4+ T cells epigenetically modified by oxidative stress cause lupus-like autoimmunity in mice. *Journal of Autoimmunity* vol. 62, p. 75-80. [https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.06.004]
- SUGITA-KONISHI, Y., SHIMURA, S., NISHIKAWA, T., *et al.* (2003) Effect of Bisphenol A on non-specific immunodefenses against non-pathogenic *Escherichia coli*. *Toxicology Letters* vol. 136, n° 3, p. 217-227. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00388-0]

- SULTAN, C., BALAGUER, P., TEROUANNE, B., *et al.* (2001) Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Molecular and Cellular Endocrinology* vol. 178, n° 1, p. 99-105. [[https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00430-0](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00430-0)]
- SUMPTER, J.P., JOBLING, S. (1995) Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives* vol. 103, n° suppl 7, p. 173-178. [<https://doi.org/10.1289/ehp.95103s7173>]
- SUN, H., CHEN, N., YANG, X., *et al.* (2021) Effects induced by polyethylene microplastics oral exposure on colon mucin release, inflammation, gut microflora composition and metabolism in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety* vol. 220, p. 112340. [<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112340>]
- SUN, L., HU, J., ZHAO, Z., *et al.* (2003) Influence of exposure to environmental lead on serum immunoglobulin in preschool children. *Environmental Research* vol. 92, n° 2, p. 124-128. [[https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(02\)00090-7](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(02)00090-7)]
- SUSSAN, T.E., GAJGHATE, S., THIMMULAPPA, R.K., *et al.* (2015) Exposure to Electronic Cigarettes Impairs Pulmonary Anti-Bacterial and Anti-Viral Defenses in a Mouse Model. *PLoS One* vol. 10, n° 2, p. e0116861. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116861>]
- SUZUKI, T., HIDAKA, T., KUMAGAI, Y., *et al.* (2020) Environmental pollutants and the immune response. *Nature Immunology* vol. 21, n° 12, p. 1486-1495. [<https://doi.org/10.1038/s41590-020-0802-6>]
- SZAFRAN, B.N., PINKSTON, R., PERVEEN, Z., *et al.* (2020) Electronic-Cigarette Vehicles and Flavoring Affect Lung Function and Immune Responses in a Murine Model. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21, n° 17, p. 6022. [<https://doi.org/10.3390/ijms21176022>]
- TALLIMA, H., EL RIDI, R. (2017) Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits – A review. *Journal of Advanced Research* vol. 11, p. 33-41. [<https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.11.004>]
- THIRIÓN-ROMERO, I., PÉREZ-PADILLA, R., ZABERT, G., *et al.* (2019) Respiratory Impact of Electronic Cigarettes and Low-Risk Tobacco. *Revista de Investigación Clínica* vol. 71, n° 1. [<https://doi.org/10.24875/RIC.18002616>]
- THUESON, L.E., EMMONS, T.R., BROWNING, D.L., *et al.* (2015) In vitro Exposure to the Herbicide Atrazine Inhibits T Cell Activation, Proliferation, and Cytokine Production and Significantly Increases the Frequency of Foxp3+ Regulatory T Cells. *Toxicological Sciences* vol. 143, n° 2, p. 418-429. [<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu242>]
- TISSIER, R. (2020) Les Toxiques minéraux, Cours, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, Unité pédagogique de Toxicologie et Pharmacologie. Maisons-Alfort.
- TOTTI, N., MCCUSKER, K.T., CAMPBELL, E.J., *et al.* (1984) Nicotine is Chemotactic for Neutrophils and Enhances Neutrophil Responsiveness to Chemotactic Peptides. *Science* vol. 223, n° 4632, p. 169-171. [<https://doi.org/10.1126/science.6318317>]
- TOU, J., URBIZO, C. (2008) Diethylstilbestrol inhibits phospholipase D activity and degranulation by stimulated human neutrophils. *Steroids* vol. 73, n° 2, p. 216-221. [<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2007.10.002>]
- TRZIL, J.E. (2020) Feline Asthma: Diagnostic and Treatment Update. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* vol. 50, n° 2, p. 375-391. [<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.10.002>]
- TSENG, C.-H. (2002) An Overview on Peripheral Vascular Disease in Blackfoot Disease-Hyperendemic Villages in Taiwan. *Angiology* vol. 53, n° 5, p. 529-537. [<https://doi.org/10.1177/000331970205300505>]
- UC DAVIS VMTH (2011) Hematology Reference Intervals. *In Scribd*. [<https://www.scribd.com/document/348114909/UC-Davis-VMTH-Hematology-Reference-Intervals>] (consulté le 07/08/2023).

- ÜNDEĞER, Ü., BAŞARAN, N., CANPMAR, H., *et al.* (1996) Immune alterations in lead-exposed workers. *Toxicology* vol. 109, n° 2, p. 167-172. [[https://doi.org/10.1016/0300-483X\(96\)03333-1](https://doi.org/10.1016/0300-483X(96)03333-1)]
- U.S. ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION (2023) Glossary. In *Energy Information Administration*. [<https://www.eia.gov/tools/glossary/index.php>] (consulté le 31/03/2023).
- US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (2018) The 2011 National Emissions Inventory. In *United States Environmental Protection Agency*. [<https://www.epa.gov/air-emissions-inventories/previous-nei-reports>] (consulté le 06/04/2023).
- USTYUGOVA, I.V., FROST, L.L., VANDYKE, K., *et al.* (2007) 3,4-Dichloropropionaniline Suppresses Normal Macrophage Function. *Toxicological Sciences* vol. 97, n° 2, p. 364-374. [<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm048>]
- VALLVERDÚ-COLL, N., MATEO, R., MOUGEOT, F., *et al.* (2019) Immunotoxic effects of lead on birds. *The Science of the Total Environment* vol. 689, p. 505-515. [<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.251>]
- VANDYKE, D., IGLESIAS, M., TOMALA, J., *et al.* (2022) Engineered human cytokine/antibody fusion proteins expand regulatory T cells and confer autoimmune disease protection. *Cell Reports* vol. 41, n° 3, p. 111478. [<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111478>]
- VAS, J., MONESTIER, M. (2008) Immunology of Mercury. *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 1143, n° 1, p. 240-267. [<https://doi.org/10.1196/annals.1443.022>]
- VELÁZQUEZ-PÉREZ, R., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, E., VALDÉS-FUENTES, M., *et al.* (2021) Oxidative Stress Caused by Ozone Exposure Induces Changes in P2X7 Receptors, Neuroinflammation, and Neurodegeneration in the Rat Hippocampus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* vol. 2021, p. 3790477. [<https://doi.org/10.1155/2021/3790477>]
- VERMEULEN, A., MÜLLER, W., MATSON, K.D., *et al.* (2015) Sources of variation in innate immunity in great tit nestlings living along a metal pollution gradient: an individual-based approach. *The Science of the Total Environment* vol. 508, p. 297-306. [<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.095>]
- VON BUTTLAR, H., BISMARCK, D., ALBER, G. (2015) Peripheral canine CD4+CD8+ double-positive T cells – unique amongst others. *Veterinary Immunology and Immunopathology* vol. 168, n° 3, p. 169-175. [<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.09.005>]
- WANG, D., ZHOU, R., YAO, Y., *et al.* (2010) Stimulation of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor by Nicotine Increases Suppressive Capacity of Naturally Occurring CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Mice In Vitro. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* vol. 335, n° 3, p. 553-561. [<https://doi.org/10.1124/jpet.110.169961>]
- WANG, H., PENG, W., WENG, Y., *et al.* (2012) Imbalance of Th17/Treg cells in mice with chronic cigarette smoke exposure. *International Immunopharmacology* vol. 14, n° 4, p. 504-512. [<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.09.011>]
- WANG, H., YU, M., OCHANI, M., *et al.* (2003) Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* vol. 421, n° 6921, p. 384-388. [<https://doi.org/10.1038/nature01339>]
- WANG, I.-J., KARMAUS, W.J.J., YANG, C.-C. (2017a) Lead exposure, IgE, and the risk of asthma in children. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* vol. 27, n° 5, p. 478-483. [<https://doi.org/10.1038/jes.2017.5>]
- WANG, I.-J., KARMAUS, W.J.J., YANG, C.-C. (2017b) Polycyclic aromatic hydrocarbons exposure, oxidative stress, and asthma in children. *International Archives of Occupational and Environmental Health* vol. 90, n° 3, p. 297-303. [<https://doi.org/10.1007/s00420-017-1198-y>]
- WANG, L., JOAD, J.P., ABEL, K., *et al.* (2007) Effects of environmental tobacco smoke on the developing immune system of infant monkeys. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 120, n° 2, p. 445-451. [<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.03.028>]

- WANG, L., WU, N., ZHANG, Y., *et al.* (2022) Effects of copper on non-specific immunity and antioxidant in the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* vol. 236, p. 113465. [<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113465>]
- WATERMAN, S.J., EL-FAWAL, H.A., SNYDER, C.A. (1994) Lead alters the immunogenicity of two neural proteins: a potential mechanism for the progression of lead-induced neurotoxicity. *Environmental Health Perspectives* vol. 102, n° 12, p. 1052-1056.
- WAXMAN, H.A., MARKEY, E.J., DEGETTE, D. (2011) Chemicals Used in Hydraulic Fracturing. *In US House of Representatives Committee on Energy and Commerce Minority Staff*. [<https://www.damascuscitizensforsustainability.org/wp-content/uploads/2012/03/dems.energy.Hydraulic-Fracturing-Report-4.18.11.pdf>] (consulté le 31/03/2023).
- WEISS, D.J., WARDROP, K.J. (2010) Schalm's Veterinary Hematology, 6th Edition. Ames, Wiley-Blackwell.
- WEISS, H.J., O'NEILL, L.A.J. (2022) Of Flies and Men—The Discovery of TLRs. *Cells* vol. 11, n° 19, p. 3127. [<https://doi.org/10.3390/cells11193127>]
- WESSELS, I., HAASE, H., ENGELHARDT, G., *et al.* (2013) Zinc deficiency induces production of the proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF α in promyeloid cells via epigenetic and redox-dependent mechanisms. *The Journal of Nutritional Biochemistry* vol. 24, n° 1, p. 289-297. [<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.06.007>]
- WESTMAN, M., ENGSTRÖM, M., CATRINA, A.I., *et al.* (2009) Cell Specific Synovial Expression of Nicotinic Alpha 7 Acetylcholine Receptor in Rheumatoid Arthritis and Psoriatic Arthritis. *Scandinavian Journal of Immunology* vol. 70, n° 2, p. 136-140. [<https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02266.x>]
- WILLIAMS, C.L., ENG, A., BOTVIN, G.J., *et al.* (1979) Validation of students' self-reported cigarette smoking status with plasma cotinine levels. *American Journal of Public Health* vol. 69, n° 12, p. 1272-1274.
- WILLIAMS, D.E., LECH, J.J., BUHLER, D.R. (1998) Xenobiotics and xenoestrogens in fish: modulation of cytochrome P450 and carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* vol. 399, n° 2, p. 179-192. [[https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00255-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00255-8)]
- WILLIAMS, M., VILLARREAL, A., BOZHILOV, K., *et al.* (2013) Metal and Silicate Particles Including Nanoparticles Are Present in Electronic Cigarette Cartomizer Fluid and Aerosol. *PLoS ONE* vol. 8, n° 3, p. e57987. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057987>]
- WIRTH, N., ABOU-HAMDAN, K., SPINOSA, A., *et al.* (2005) Le tabagisme passif. *Revue de Pneumologie Clinique* vol. 61, n° 1, Part 1, p. 7-15. [[https://doi.org/10.1016/S0761-8417\(05\)84776-5](https://doi.org/10.1016/S0761-8417(05)84776-5)]
- WOOD, J.C.S. (1998) Principles of Gating. *Current Protocols in Cytometry* vol. 3, n° 1, p. 1.8.1-1.8.12. [<https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0108s03>]
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2022) Arsenic. [<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>] (consulté le 07/12/2022).
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2021) Exposure to Mercury: a major public health concern. *In World Health Organization*. [<https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240023567>] (consulté le 16/12/2022).
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1995) Inorganic lead. *In World Health Organization*. [<https://apps.who.int/iris/handle/10665/37241>] (consulté le 08/12/2022).
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1981) Arsenic, Environmental health criteria 18. *In Dépôt Institutionnel Pour Le Partage de l'information*. [<https://apps.who.int/iris/handle/10665/336068>] (consulté le 08/12/2022).
- WU, J.-P., LUO, X.-J., ZHANG, Y., *et al.* (2008) Bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in wild aquatic species from an electronic

- waste (e-waste) recycling site in South China. *Environment International* vol. 34, n° 8, p. 1109-1113. [https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.04.001]
- XIE, Y.C., SCHAFFER, R., BARNETT, J.B. (1997) The Immunomodulatory Effects of the Herbicide Propanil on Murine Macrophage Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- α Production. *Toxicology and Applied Pharmacology* vol. 145, n° 1, p. 184-191. [https://doi.org/10.1006/taap.1997.8179]
- XU, H., LAUER, F.T., LIU, K.J., *et al.* (2016) Environmentally relevant concentrations of arsenite and monomethylarsonous acid inhibit IL-7/STAT5 cytokine signaling pathways in mouse CD3+CD4-CD8- double negative thymus cells. *Toxicology Letters* vol. 247, p. 62-68. [https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.02.014]
- YAMAYA, M., ZAYASU, K., SEKIZAWA, K., *et al.* (1989) Acute effect of cigarette smoke on cytoplasmic motility of alveolar macrophages in dogs. *Journal of Applied Physiology* vol. 66, n° 3, p. 1172-1178. [https://doi.org/10.1152/jappl.1989.66.3.1172]
- YAN, H., TAKAMOTO, M., SUGANE, K. (2008) Exposure to Bisphenol A Prenatally or in Adulthood Promotes TH2 Cytokine Production Associated with Reduction of CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *Environmental Health Perspectives* vol. 116, n° 4, p. 514-519. [https://doi.org/10.1289/ehp.10829]
- YOSHINO, S., YAMAKI, K., LI, X., *et al.* (2004) Prenatal exposure to bisphenol A up-regulates immune responses, including T helper 1 and T helper 2 responses, in mice. *Immunology* vol. 112, n° 3, p. 489-495. [https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01900.x]
- YU, H., YANG, Y.-H., RAJAIAH, R., *et al.* (2011) Nicotine-induced differential modulation of autoimmune arthritis in the Lewis rat involves changes in interleukin-17 and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies. *Arthritis & Rheumatism* vol. 63, n° 4, p. 981-991. [https://doi.org/10.1002/art.30219]
- YU, M., ZHENG, X., PEAKE, J., *et al.* (2008) Perinatal environmental tobacco smoke exposure alters the immune response and airway innervation in infant primates. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 122, n° 3, p. 640-647.e1. [https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.04.038]
- ZABRODSKII, P.F., GRISHIN, V.A., BORODAVKO, V.K. (2013) Mechanism of Suppression of Phagocytic and Metabolic Activity of Neutrophils and Production of Proinflammatory Cytokines during Chronic Poisoning with Organophosphorus Compounds. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* vol. 155, n° 4, p. 464-466. [https://doi.org/10.1007/s10517-013-2179-0]
- ZHANG, J., WEI, Y., FANG, Z. (2019) Ozone Pollution: A Major Health Hazard Worldwide. *Frontiers in Immunology* vol. 10, p. 2518. [https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02518]
- ZHANG, S., PETRO, T.M. (1996) The effect of nicotine on murine CD4 T cell responses. *International Journal of Immunopharmacology* vol. 18, n° 8, p. 467-478. [https://doi.org/10.1016/S0192-0561(96)00054-9]
- ZHANG, Y., YU, X., SUN, S., *et al.* (2016) Cadmium modulates hematopoietic stem and progenitor cells and skews toward myelopoiesis in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* vol. 313, p. 24-34. [https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.10.016]

Annexe 1 : Formulaire de validation du protocole expérimental par le ComERC



Comité d'Ethique en Recherche Clinique (ComERC)
Ecole nationale vétérinaire d'Alfort
7, avenue du Général de Gaulle
94704 Maisons-Alfort Cedex

A Madame Delphine Le Roux

Maisons-Alfort le, 22 octobre 2021

N° du dossier : 2021-07-09

Objet : Avis du ComERC

Madame,

Le ComERC a procédé à l'examen de votre saisine concernant le projet intitulé «**Effets de la pollution environnementale sur le système immunitaire du chien**» et vous informe que votre projet a reçu un **Avis favorable**.

Veillez croire, Madame, en l'expression de nos salutations distinguées.

Pour le ComERC, sa Présidente.
Caroline GILBERT

École nationale vétérinaire d'Alfort
7, avenue du Général de Gaulle – 94704 Maisons-Alfort Cedex
Tel: 33 (0)1 43 96 71 00 – Fax: 33 (0)1 43 96 71 25 – www.vet-alfort.fr
SIRET: 199 406 083 000 14 – N° TVA: FR55 199 406 083

Annexe 2 : Questionnaire d'inclusion dans l'étude donné aux propriétaires

<p style="text-align: center;"><u>QUESTIONNAIRE D'INCLUSION DANS L'ETUDE POUR LA THESE :</u> Effets de la pollution environnementale sur le système immunitaire des chiens</p>
--

Nous vous remercions de votre participation à cette étude pour une thèse de Doctorat vétérinaire. Les critères d'inclusion dans cette étude sont les suivants : chiens entre 1 et 8 ans pesant plus de 2 kilos et non vaccinés dans les 3 semaines précédant la prise de sang.

Pour effectuer le traitement des données, nous aurons besoin d'informations supplémentaires qui vous seront demandées dans ce questionnaire. Merci de le remplir avec la plus grande précision.

Propriétaire :

- Etes-vous fumeur ? Oui / Non
- Si oui, vous fumez :
 - o En Intérieur
 - o En extérieur
 - o A la fenêtre
 - o Autre (Précisez) :

Animal :

- Quelle est la race de votre animal ?
- Votre animal est :
 - o Un mâle entier
 - o Un mâle castré
 - o Une femelle entière
 - o Une femelle stérilisée
- Quel âge a votre animal ?
- Quel est le poids de votre animal ?
- Quand a eu lieu le dernier vaccin de votre animal ?
- Votre animal vit-il en région parisienne ? Oui / Non
- Donnez une estimation de l'exposition de votre animal au tabac (en cigarette par jour) :
- Votre animal est-il exposé régulièrement à des encens, bougies, fumée de cheminée ?
Si oui, merci de donner une fréquence.

Annexe 3 : Formulaire de consentement à la participation dans l'étude

CONSENTEMENT DE PARTICIPATION A LA THESE DE DOCTORAT VETERINAIRE : Effets de la pollution environnementale sur le système immunitaire des chiens

Propriétaire

Nom et prénom :

Adresse :

Adresse mail :

Animal

Nom :

Il m'a été proposé de participer à cette étude, dirigée par le Dr LE ROUX (Service d'immunologie – BioPôle Alfort) dans le cadre d'une thèse de Doctorat Vétérinaire.

Il m'a été précisé que je suis libre d'accepter ou de refuser.

J'ai reçu et bien compris les informations suivantes :

- But de la recherche : Cette étude a pour but de comparer certains paramètres sanguins du système immunitaire (comme les globules blancs par exemple) des chiens exposés ou non à la fumée de cigarette.
- Durée : Temps des prélèvements (prise de sang)
- Méthodes utilisées : Analyses en laboratoire (NFS, cytométrie de flux et ELISA)
- Contraintes : Ponction de la veine jugulaire ou de la veine saphène
- Risques : Douleur, Hématome suite à la prise de sang.

Suite à l'analyse des résultats, il est possible que des informations supplémentaires soient nécessaires :

J'accepte d'être éventuellement recontacté(e) dans le cadre de cette étude : Oui Non

Je, soussigné(e) _____ déclare accepter, librement, et de façon éclairée, de participer à l'étude dans les conditions précisées ci-dessus. Mon consentement ne décharge pas les organisateurs de la recherche de leurs responsabilités.

Conformément à la loi, vous disposez d'un droit d'accès, de rectification et d'opposition aux informations qui vous concernent. Si vous souhaitez exercer ce droit et/ou obtenir des informations vous concernant, veuillez-vous adresser à Delphine LE ROUX : delphine.le-roux@vet-alfort.fr

Fait à Maisons-Alfort en deux exemplaires le .../.../...

Signature de l'investigateur :

Signature du propriétaire,
précédée de la mention « lu et approuvé » :

Annexe 4 : Données brutes d'inclusion des chiens dans l'étude

Tableau 13 : Données d'inclusion dans l'étude.

Numéros et Groupe	Age (ans)	Race	Sexe	Poids (kg)	Exposition à la cigarette (cigarettes/jour)	Lieu d'exposition	Santé, Antécédents connus	Informations complémentaires
1 NE	3	Berger blanc suisse	Mâle castré	38	0		Dysplasie, Sensibilité gastro-intestinale	Utilisation d'e-cigarette
2 E	2,5	Labrador	Mâle castré	41	< 5	Int, Ext	Epilepsie il y a 2 semaines, Obésité	SO
3 E	2,8	Labrador	Femelle stérilisée	25	2	Fenêtre, Ext	SO	SO
4 E	1,3	X Berger Allemand	Mâle castré	28	0,5	Int, Fenêtre, Ext	SO	SO
5 E	2	Beauceron	Femelle stérilisée	35	ND	Int, Ext	SO	SO
6 E	6	X Beauceron	Mâle castré	22	0,1	Int	SO	SO
7 NE	6	Beagle	Femelle stérilisée	13,75	0		SO	SO
8 NE	1	X	Femelle stérilisée	25,4	0		SO	SO
9 NE	2,5	X Samoyède/Berger australien	Mâle castré	25	0		SO	SO
10 NE	2	X Berger	Mâle castré	36	0		SO	SO
11 NE	2,5	Labrador	Mâle castré	31,2	0		SO	SO
12 NE	3	X Berger australien	Femelle stérilisée	23	0		SO	SO
13 NE	1,2	Golden retriever	Mâle castré	25,5	0		Cardiopathie connue	SO
14 NE	3	Berger des shetlands	Femelle stérilisée	9	0		SO	SO
15 NE	3,5	X	Mâle castré	12	0		SO	SO
16 NE	1,1	Bouvier d'appenzell	Mâle castré	23	0		SO	SO
17 NE	3,5	X Berger	Femelle stérilisée	35,5	0		SO	SO
18 NE	3,8	Boxer	Mâle entier	30	0		SO	SO
19 NE	5	X Berger allemand/Malinois	Mâle castré	40	0		SO	Utilisation d'e-cigarette
20 E	3,5	X Border Collie/ Setter anglais/ Colley	Femelle stérilisée	15	3 à 5	Int, Fenêtre, Ext	SO	Exposition fumée cannabis et tabac mélangé occasionnellement
21 E	5	X Berger	Mâle castré	23	ND	Int	SO	Exposition cheminée occasionnellement

Numéros et Groupe	Age (ans)	Race	Sexe	Poids (kg)	Exposition à la cigarette (cigarettes/jour)	Lieu d'exposition	Santé, Antécédents connus	Informations complémentaires
22 NE	1,5	Berger allemand type ancien	Mâle entier	37	0		Sensibilité gastro-intestinale	SO
24 NE	3,7	Spitz allemand nain	Femelle stérilisée	3,5	0		SO	SO
25 NE	2	Golden retriever	Mâle castré	30	0		SO	SO
26 NE	5,5	X Shih tzu	Mâle castré	9	0		SO	SO
27 NE	4,8	X Malinois	Femelle stérilisée	26	0		SO	SO
28 NE	2,5	X Berger australien/Beauceron	Mâle castré	30	0		SO	SO
29 NE	2,3	Labrador	Femelle stérilisée	28,1	0		Dysplasie des hanches	SO
30 NE	2,5	X Berger australien/Bouvier bernois/Saint bernard	Femelle entière	26	0		SO	SO
31 NE	3	X Berger australien/Samoyède	Mâle castré	33	0		SO	Exposition cheminée occasionnellement
32 E	4	Cocker	Mâle castré	14	ND	Int	SO	SO
33 E	3	X Labrador/ Golden retriever	Mâle castré	36	0,2	Int	SO	Exposition fumée cannabis et tabac mélangé occasionnellement
34 E	1	X Berger	Mâle castré	15	ND	Int	SO	Exposition cheminée occasionnellement
35 NE	1,5	Berger belge	Mâle castré	30	0		SO	
36 NE	2,5	Border Terrier	Femelle stérilisée	7	0		SO	Exposition cheminée occasionnellement
37 NE	5	Border Collie	Femelle entière	22,5	0		Souffle cardiaque 2/6 sans impact clinique	Exposition bougies occasionnellement
38 NE	9	Lévrier	Femelle entière	10	0		SO	Exposition bougies occasionnellement
39 NE	1,2	Labrador	Femelle stérilisée	22	0		Ovariectomie il y a 1 semaine	SO
40 E	2,5	Flat coated retriever	Mâle castré	38	ND	Int, Ext	Otitis chroniques	SO
41 NE	3	Beagle	Mâle castré	13	0		SO	Exposition bougies fréquemment

SO = Sans objet,
ND = Non déterminable,
Int = Intérieur, Ext = Extérieur,
X = Croisé,
NE = Non exposé, E = Exposé

Annexe 5 : Données brutes de NFS

Tableau 14 : Données de NFS.

Numéros Echantillons	GR (10 ⁶ /μL)	GB (10 ³ /μL)	Neutrophiles (10 ³ /μL)	Eosinophiles (10 ³ /μL)	Basophiles (10 ³ /μL)	Monocytes (10 ³ /μL)	Lymphocytes (10 ³ /μL)	Plaquettes (10 ³ /μL)	Messages machine
1	7,57	11,07	5,36	3,02	0,02	0,84	1,83	183	Eosinophilie
2	7,55	10,6	5,25	2,67	0,02	0,81	1,85	195	Eosinophilie
3	7,29	7,79	3,81	0,51	0,04	0,57	2,86	57	Thrombocytopenie
4	7,32	6,87	2,97	0,26	0,14	0,6	2,9	29	Neutropénie, Thrombocytopenie
5	7,25	9,33	4,52	0,51	0,07	0,53	3,7	272	
6	7,02	4,45	NE	NE	0,01	NE	NE	163	Erreur machine
7	7,97	6,12	3,66	0,22	0,01	0,27	1,96	123	Thrombocytopenie
8	7,52	10,31	5,81	0,38	0,05	0,73	3,34	248	
9	7,7	6,26	3,88	0,09	0,01	0,34	1,94	71	Thrombocytopenie
10	6,48	8,85	4,67	0,56	0,04	0,42	3,16	113	Thrombocytopenie
11	7,1	11,66	7,2	0,53	0,02	0,52	3,39	280	
12	6,78	6,01	3,58	0,17	0,01	0,36	1,89	138	Thrombocytopenie
13	6,68	12,82	7,08	0	0,03	0,77	4,94	205	Lymphocytose, Réticulocytes 0,11.10 ⁶ /μL
14	7,26	7,29	3,96	0,52	0,04	0,51	2,26	125	Thrombocytopenie
15	8,51	10,99	4,46	2,91	0,02	0,73	2,87	166	Erythrocytose, Eosinophilie
16	6,31	7,84	3,34	0,34	0,01	0,46	2,69	257	
17	7,4	6,06	3,54	0,15	0,01	0,28	2,08	190	
18	8,01	10,41	7,47	0,61	0,01	0,57	1,75	165	
19	8,89	8,01	4,13	0,36	0,02	0,59	2,91	174	Erythrocytose
20	6,97	7,56	3,98	0,6	0,01	0,39	2,58	304	
21	7,06	5,22	2,54	0,26	0,02	0,38	2,02	101	Neutropénie, Leucocytopenie, Thrombocytopenie
22	7,39	13,74	9,4	0,52	0,04	0,82	2,96	233	Leucocytose
24	7,61	12,34	7,96	0,49	0,02	0,33	3,54	401	Réticulocytose 0,15.10 ⁶ /μL
25	6,84	8,81	4,82	0,35	0,02	0,34	3,28	278	
26	8,42	7,88	5,01	0,37	0,02	0,46	2,02	323	
27	6,97	8,11	4,33	0,37	0,01	0,63	2,77	192	
28	6,91	6,84	3,43	0,57	0,01	0,45	2,38	150	
29	6,47	9,09	3,88	0,75	0,01	0,29	4,16	194	
30	6,22	10,74	6,15	1,89	0,01	0,49	2,2	182	Eosinophilie
31	6,99	9,81	6,44	0,52	0,01	0,27	2,57	134	Réticulocytose 0,16.10 ⁶ /μL,

Numéros Echantillons	GR (10 ⁶ /μL)	GB (10 ³ /μL)	Neutrophiles (10 ³ /μL)	Eosinophiles (10 ³ /μL)	Basophiles (10 ³ /μL)	Monocytes (10 ³ /μL)	Lymphocytes (10 ³ /μL)	Plaquettes (10 ³ /μL)	Messages machine
									Thrombocytopenie
32	7,79	14,71	NE	NE	0,02	NE	NE	68	Erreur Machine
33	7	7,75	4,31	0,53	0,01	0,43	2,47	299	
34	6,63	12,75	7,96	0,55	0,03	0,78	3,43	304	
35	7,97	12,72	6,01	1,46	0,03	0,63	4,59	186	Eosinophilie
36	6,66	11,42	6,55	1,31	0,03	0,63	2,9	158	Eosinophilie
37	7,61	7,66	4,95	0,44	0,01	0,25	2,01	512	Réticulocytose 0,15.10 ⁶ /μL
38	7,83	5,61	3,93	0,15	0	0,31	1,22	273	Leucocytopenie
39	6,73	9,48	4,55	0,52	0,01	0,58	3,82	203	
40	5,73	15,03	11,07	0,75	0	0,6	2,61	322	Leucocytose
41	7,59	10,74	5,52	0,73	0,03	0,71	3,75	303	

NE = Non évalué

Annexe 6 : Données brutes de cytométrie de flux

Tableau 15 : Données de cytométrie de flux pour le « Mix 1 » donnant le phénotype des lymphocytes.

Numéros d'échantillon	« Mix 1 » Phénotype des lymphocytes : anticorps anti-CD45, CD3, CD21		
	% CD45+ parmi lymphocytes	Parmi les cellules CD45+	
		CD3+ CD21-	CD3- CD21 +
		LT (%)	LB (%)
1	99,4	77,1	16,2
2	99,1	84,1	11
3	99,3	83,2	12,6
4	99,2	73,4	20
5	98,3	63,8	28,3
6	99,6	79,8	15,3
7	95,2	74,1	19,5
8	98,1	78,5	13,9
9	98,5	67	24,8
10	99,5	81,7	13,6
11	98,8	80,3	13,1
12	98	81,9	12,9
13	99,5	76,1	16,5
14	99,1	70,2	22,4
15	96,3	66,3	22,5
16	98,8	57,7	35,4
17	98,4	81	13,7
18	92,3	70	16,8
19	98,3	85	8
20	95,6	68	26,3
21	98	75,3	18
22	98,3	68,9	16
24	99	71,6	18,7
25	96,7	73,4	19,5
26	94,8	73	16,4
27	96,4	69,6	22,3
28	98,6	87,7	6,1
29	99,2	84,6	9
30	95,8	83,3	9,2
31	98,1	72,6	18,8
32	98,6	67,6	18,2
33	98,1	77,8	14
34	97,7	71,9	16,5
35	97,9	63,9	20,8
36	98,7	78,3	13,7
37	97,2	69,1	5,8
38	97,9	78,4	12

39	98,6	78,1	14,7
40	97,7	80,2	11,8
41	97,6	71,2	17

Tableau 16 : Données de cytométrie de flux pour le « Mix 2 » donnant le phénotype des lymphocytes T.

Numéros d'échantillon	« Mix 2 » Phénotype LT : anticorps anti-CD3, CD4, CD8				
	% CD3+ parmi lymphocytes	Parmi les cellules CD3+			
		CD4+ CD8- LT CD4 (%)	CD4+ CD8+ (%)	CD4- CD8 + LT CD8 (%)	CD4- CD8- (%)
1	81	33,4	0,8	43,5	22,2
2	86,6	51,6	1,1	31,3	15,9
3	86,3	60,7	0,5	23,9	14,8
4	78,8	54,5	0,8	25,8	19
5	71,2	41,2	0,6	42,1	16
6	83,1	60,9	1,5	25	12,5
7	78,0	61,5	1,4	18,0	19,1
8	78,4	53,0	0,4	33,7	12,8
9	72,6	54,6	0,8	21,3	23,2
10	84,7	58,8	0,6	25,8	14,8
11	85,2	60,5	0,7	15,5	23,3
12	84,7	54	1,3	30,1	14,6
13	81,2	64,1	0,4	19,2	16,3
14	74,6	58,4	1	18,3	22,3
15	71,4	48,9	1	30,5	19,6
16	59,6	55,1	0,6	26,2	18,2
17	80,9	64,5	0,4	22,8	12,3
18	61,4	64,4	1,2	23,7	10,6
19	84,8	51,7	0,5	36,4	11,3
20	67,8	70,8	1	16,9	11,3
21	73,9	60,4	0,9	19	19,7
22	70,3	57,9	0,9	26,6	14,5
24	74,3	58,6	0,8	26,6	13,9
25	75,7	61,6	0,7	20,1	17,7
26	73,4	52,2	0,9	26,7	20,2
27	68,5	51	1	29,3	18,7
28	87,5	49	0,7	34,1	16,2
29	84,7	53,9	0,5	25,9	19,8
30	82,1	59,3	1,1	20,6	19
31	75,6	52,5	0,7	22,9	23,9
32	83,6	50,3	1,5	20,8	27,4
33	86,5	53,8	0,9	20,5	24,8
34	77,7	51,8	1,3	25,1	21,8
35	72,6	40	0,8	28,8	30,4
36	82,8	45,3	0,8	41,8	12,1
37	72,2	40	1,3	40,9	17,8
38	84,6	40,7	1,5	38,2	19,6
39	83,3	59,5	0,3	24	16,2
40	84,7	53,4	0,5	27,8	18,4
41	76	43	1,1	30,2	25,8

Tableau 17 : Données de cytométrie de flux pour le « Mix 3 » donnant le phénotype des cellules myéloïdes.

Numéros d'échantillon	« Mix 3 » Cellules myéloïdes : anticorps anti-CD11b, MHCII, CD14				
	% CD11b+ parmi les PBMCs	Parmi les cellules CD11b+			
		MHCII+ CD14-	MHCII+ CD14+	MHCII- CD14+	MHCII- CD14-
		LB contaminants (%)	Monocytes (%)	Monocytes immatures ou neutrophiles contaminants (%)	MDSC (= Cellules myéloïdes suppressives) (%)
1	58,2	2	48,8	7,8	41,4
2	33,6	0,9	47,3	48,3	3,5
3	38,5	0,2	29	62,4	8,5
4	32,8	2,7	36,5	54,6	6,2
5	20,1	1,6	60,1	21,4	16,8
6	21,3	4,4	44,9	39,5	11,2
7	33,5	3	51,2	40	5,8
8	25,9	7,9	64,4	5,3	22,4
9	35,8	1,8	51	24	23,2
10	19,8	6,3	58,9	16,8	18
11	23,7	2,1	48,4	29,5	20
12	18,1	3,7	84,5	5,1	6,6
13	15,5	6	51,5	16,5	26
14	18,8	4,3	75,6	4,9	15,2
15	53,7	41,3	56,5	1,5	0,7
16	25	2,7	85,4	4,2	7,8
17	16,6	14,9	73,4	9,9	1,7
18	35,9	24,6	63,3	10,7	1,4
19	18	9,8	71,6	17,4	1,2
20	24,3	35,1	45,3	19,3	0,3
21	19,2	31,6	60,2	7,1	1,1
22	31,3	24,8	65	10	0,2
24	22,6	31,5	47,9	17,6	3
25	12,7	13,8	84,1	2	0,1
26	18,6	7	89,2	3,7	0,1
27	21,6	13,9	78,8	5	2,3
28	16,8	22,5	76	1,1	0,5
29	17,1	32,2	66,4	0,8	0,6
30	41,3	6,5	91,8	1,6	0,2
31	25,6	10	83	6,5	0,5
32	46,2	13,3	76	5,4	5,3
33	28	38,6	44,6	10	6,8
34	28,5	10,2	81,1	4,8	3,9
35	32,9	21	74,5	3,6	0,9
36	22,6	24,8	71,6	3,1	0,5
37	22,1	18,5	78,2	2,8	0,5
38	18,4	11,4	85	3,3	0,4
39	20	16,9	78,8	4,1	0,2
40	39	15,9	76,4	7,2	0,5
41	27,1	13,6	84,3	1,4	0,7

Annexe 7 : Données brutes des ELISA cytokines IL-6 et TNF α

Tableau 18 : Données des ELISA IL-6 et TNF α .

Numéros d'échantillon	IL-6			TNF α
	Concentration (pg/mL) essai 1 corrigée d'un facteur 10	Concentration (pg/mL) essai 2	Moyenne des deux essais (pg/mL)	Concentration (pg/mL)
1	350,8	509,8	430,3	72,2
2	ND	3441,8	3441,8	95,1
3	13,6	24,6	19,1	1,7
4	98,3	121,5	109,9	1,0
5	208,7	283,3	246,0	5,0
6	136,4	297,5	216,9	1,1
7	257,2	485,0	371,1	6,9
8	21,3	≤10	21,3	1,3
9	24,5	12,0	18,2	5,4
10	≤ 6,25	NE	6,3	0,1
11	16,0	≤10	16,0	1,7
12	415,0	496,8	455,9	4,0
13	ND	1692,0	1692,0	68,9
14	ND	2006,8	2006,8	88,3
15	18,9	≤10	18,9	1,7
16	≤ 6,25	NE	6,3	1,0
17	16,0	46,2	31,1	0,9
18	≤ 6,25	NE	6,3	0,2
19	≤ 6,25	NE	6,3	0,7
20	104,5	338,4	221,4	10,0
21	115,4	156,2	135,8	0,7
22	160,1	343,6	251,9	5,2
24	28,5	≤10	28,5	3,0
25	ND	2329,5	2329,5	89,1
26	96,9	407,7	252,3	9,4
27	≤ 6,25	NE	6,3	2,1
28	ND	12454,0	12454,0	148,1
29	≤ 6,25	NE	6,3	0,6
30	38,3	45,8	42,1	0,7
31	ND	1272,5	1272,5	19,8
32	≤ 6,25	NE	6,3	0,4
33	ND	1565,5	1565,5	33,8
34	83,3	89,4	86,3	4,0
35	≤ 6,25	NE	6,3	0,4
36	4,7	≤10	4,7	1,2
37	ND	5075,5	5075,5	48,6
38	31,9	11,0	21,4	3,3
39	ND	2478,5	2478,5	81,7
40	≤ 6,25	NE	6,3	1,0
41	18,5	≤10	18,5	2,9

Annexe 8 : Données brutes de l'ELISA cotinine

Tableau 19 : Données de l'ELISA cotinine

Numéros d'échantillon	Cotinine	Numéros d'échantillon	Cotinine
	Concentration (ng/mL)		Concentration (ng/mL)
1	1063,8	24	76,7
2	302,1	25	135,0
3	> 1000	26	206,0
4	503,6	27	224,3
5	< 15,2	28	>1000
6	>1000	29	196,7
7	427,2	30	1342,6
8	208,2	31	>1000
9	248,2	32	>1000
10	186,6	33	738,5
11	9,0	34	173,4
12	>1000	35	68,9
13	>1000	36	>1000
14	>1000	37	98,9
15	>1000	38	312,9
16	>1000	39	243,2
17	>1000	40	>1000
18	92,2	41	794,4
19	301,6		
20	>1000		
21	433,6		
22	179,5		

Annexe 9 : Résultats stratifiés sur le sexe des chiens

Tableau 20 : Résultats statistiques de NFS selon le sexe des chiens

		GR (10 ⁶ /μL)	GB (10 ³ /μL)	Neutrophiles (10 ³ /μL)	Eosinophiles (10 ³ /μL)	Basophiles (10 ³ /μL)	Monocytes (10 ³ /μL)	Lymphocytes (10 ³ /μL)	Plaquettes (10 ³ /μL)	Ratio Neutrophile/ Lymphocyte
Femelles Exposés	Moyenne ± SD	7,17 ± 0,17	8,23 ± 0,96	4,10 +/- 0,37			0,5 ± 0,09	3,05 ± 0,58	211 ± 134	1,37 ± 0,16
	Médiane	7,25	7,79	3,98	0,51	0,04	0,53	2,86	272	1,33
	1 ^{er} – 3 ^{ème} quartile	7,11 – 7,27	7,68 – 8,56	3,9 – 4,25	0,51 – 0,56	0,03 – 0,06	0,46 – 0,55	2,72 – 3,28	165 – 288	1,28 – 1,44
Femelles Non exposés	Moyenne	7,16 ± 0,55	8,48 ± 2,26	4,83 +/- 1,38			0,44 ± 0,17	2,63 ± 0,87	226 ± 113	1,97 ± 0,63
	Médiane	7,26	8,11	4,33	0,44	0,01	0,36	2,26	192	1,87
	1 ^{er} – 3 ^{ème} quartile	6,73 – 7,61	6,12 – 10,31	3,88 – 5,81	0,22 – 0,52	0,01 – 0,02	0,29 – 0,58	2,01 – 3,34	158 – 248	1,7 – 2,26
P-value Femelles		0,95	1	0,7	0,42	0,16	0,5	0,44	0,9	0,08
Mâles Exposés	Moyenne ± SD	7,01 ± 0,63	9,67 ± 4,19	5,68 +/- 3,27			0,6 ± 0,18	2,55 ± 0,58	185 ± 114	1,73 ± 0,72
	Médiane	7,04	9,18	4,78	0,54	0,02	0,6	2,54	179	1,5
	1 ^{er} – 3 ^{ème} quartile	6,91 – 7,38	6,46 – 13,24	3,31 – 7,28	0,33 – 0,7	0,01 – 0,02	0,47 – 0,74	1,89 – 2,58	93 – 300	1,21 – 2,18
Mâles Non exposés	Moyenne	7,46 ± 0,76	9,9 ± 2,23	5,51 +/- 1,66			0,56 ± 0,18	2,94 ± 0,92	201 ± 72	2,32 ± 1,03
	Médiane	7,48	10,11	5,19	0,53	0,02	0,55	2,89	185	2,06
	1 ^{er} – 3 ^{ème} quartile	6,89 – 7,98	7,98 – 11,22	4,34 – 6,6	0,36 – 0,64	0,01 – 0,03	0,44 – 0,72	2,29 – 3,31	161 – 262	1,46 – 2,99
P-value Mâles		0,29	0,79	0,75	1	0,7	0,63	0,46	0,74	0,15

Tableau 21 : Résultats statistiques des ELISA IL-6 et TNFα selon le sexe des chiens

		IL-6 (pg/mL)	TNFα (pg/mL)
Femelle Exposés	Médiane	221,4	5
	Premier quartile	120,3	3,3
	Troisième quartile	233,7	7,5
Femelles Non exposés	Médiane	31,1	3
	Premier quartile	21,3	1,2
	Troisième quartile	455,9	6,9
P-value Femelles		1	0,61
Mâles Exposés	Médiane	122,8	1,1
	Premier quartile	66,3	0,9
	Troisième quartile	554,1	11,4
Mâles Non exposés	Médiane	18,7	4,1
	Premier quartile	6,3	0,9
	Troisième quartile	640,8	32,1
P-value Mâles		0,78	0,56

EFFETS DE LA POLLUTION SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE DES ANIMAUX

AUTEUR : Nina CARPENTIER

RÉSUMÉ :

La pollution est un sujet d'actualité en raison de son impact sur la santé des êtres humains. Cependant, les nombreuses études visant à étudier les effets de la pollution sur la santé humaine ont amené à constater des effets sur celle des animaux et notamment sur le système immunitaire. Chez l'humain, il a été démontré que certains composés entraînent une diminution de l'immunité et favorisent alors l'apparition de maladies infectieuses ou de cancers. Il a aussi été montré que ces composants favorisent le développement de maladies auto-immunitaires. Chez l'animal, les effets de la pollution sur le système immunitaire sont moins maîtrisés car moins étudiés. Les polluants qui ont un impact immunitaire notable chez les animaux sont les métaux lourds, les polluants organiques persistants, les microplastiques et les composants de la pollution de l'air.

Afin de mieux comprendre l'impact des polluants sur le système immunitaire, une étude transversale observationnelle sur 40 chiens, dont 11 chiens exposés à la cigarette, a été réalisée. Différents marqueurs de l'inflammation systémique ont été mesurés (pourcentages des différentes cellules immunitaires sanguines par automate de numération et cytomètre de flux ; et cytokines pro-inflammatoires) ainsi que les taux de cotinine plasmatique, marqueur utilisé pour évaluer l'exposition au tabac. Aucune différence significative n'a été observée sur les pourcentages des différentes populations de lymphocytes sanguins entre les chiens « non exposés » au tabagisme passif et les chiens « exposés », excepté concernant les LT CD4+ CD8+ double positifs chez les chiens mâles. Une concentration plus importante en cytokine IL-6 dans le plasma est établie chez les chiens exposés sans différence significative cependant. Les résultats de numération, de TNF α et de cotinine n'ont pas montré de différences notables. Sur les pourcentages de monocytes sanguins identifiés par cytométrie de flux, les monocytes matures se révèlent être en nombre inférieur chez les chiens exposés par rapport aux chiens non exposés alors que les monocytes immatures sont en nombre supérieur. Par ailleurs, une influence du sexe de l'animal est mise en évidence avec des résultats similaires sur les monocytes mais chez les femelles uniquement.

Cette étude apporte une nouvelle perspective sur la compréhension de l'impact du tabagisme passif sur le chien avec l'étude d'une nouvelle population cellulaire que sont les monocytes. Un effectif plus important semble cependant nécessaire pour rendre certaines différences observées significatives. De plus, une étude plus approfondie des caractéristiques et fonctionnalités de ces cellules ainsi qu'une mesure d'un plus grand nombre de cytokines inflammatoires sanguines chez des chiens avec une exposition au tabac plus marquée paraît pertinente.

MOTS CLÉS :

POLLUTION, TABAC, TABAGISME PASSIF, IMMUNITÉ, ANIMAUX

JURY :

Présidente : Pr Caroline Gilbert

Directrice de thèse : Dr Delphine Le Roux

Examinatrice : Pr Sophie Le Poder

POLLUTION EFFECTS ON ANIMALS' IMMUNE SYSTEM

AUTHOR: Nina CARPENTIER

SUMMARY:

Pollution is a critical issue due to its significant impact on human health. However, numerous studies about the effects of pollution on human health have identified effects on animal health, particularly on the immune system. In humans, it has been established that many compounds reduce immunity, and encourage the development of infectious diseases and cancers. It has also been demonstrated that these compounds increase the development of autoimmune diseases. In animals, the effects of pollution on the immune system are less understood because less studied. The pollutants with a significant impact on the immune system in animals are heavy metals, persistent organic pollutants, microplastics and components of air pollution.

To gain a better understanding of the impact of pollutants on the immune system, a cross-sectional observational study of 40 dogs, including 11 dogs exposed to tobacco, was carried out. Various markers of systemic inflammation were measured (blood immune cells percentage using automated blood counters and flow cytometry; and pro-inflammatory cytokines) as well as plasma cotinine levels, a marker of tobacco exposure. No significant differences were observed in the percentages of the various blood lymphocyte populations between unexposed and exposed dogs to passive smoking, except for the double positive CD4+ CD8+ T lymphocytes in male dogs. A higher concentration of the cytokine IL-6 in the plasma was found in the exposed dogs, although there was no significant difference. The results for blood counts, TNF α and cotinine did not show any significant differences. Regarding the percentages of blood monocytes identified by flow cytometry, mature monocytes were found to be lower in exposed than in unexposed dogs, while immature monocytes were higher. In addition, the sex of the animal was shown to have an influence, with comparable results for monocytes, but only in females.

This study provides a new perspective on understanding the impact of passive smoking on dogs by studying a new cell population: monocytes. However, a larger sample size seems necessary to show that the observed differences are significant. In addition, a more in-depth study of the characteristics and functions of these cells and the measurement of a greater number of blood inflammatory cytokines in dogs with a higher exposure to tobacco seems to be relevant.

KEYWORDS:

POLLUTION, TABACCO, SECONDHAND SMOKE EXPOSURE, IMMUNITY, ANIMALS

JURY:

Chairperson: Pr Caroline Gilbert

Thesis Director: Dr Delphine Le Roux

Reviewer: Pr Sophie Le Poder