

L'intestin, une cible pour le déoxynivalénol et ses dérivés

Philippe PINTON (1), Dima TSYBULSKYY (1), Joëlle LAFFITTE (1), Patrick CALLU (2), Joelma LUCIOLI (3), Faouzi LYAZHRI (4), François GROSJEAN (2), Ana-Paula BRACARENSE (3), Martine KOLF-CLAUW (4), Isabelle P. OSWALD (1)

(1) INRA-TOXALIM UMR 1331 180 chemin de Tournefeuille, BP 93173, 31027 Toulouse Cedex 3, France

(2) Arvalis-Institut du végétal, Pouligne, 41100 Villerable, France

(3) Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Londrina (Parana), Brésil

(4) Université de Toulouse, Ecole Nationale Vétérinaire, 23 chemin des Capelles, BP 87614, 31300 Toulouse Cedex 3, France

philippe.pinton@toulouse.inra.fr

L'intestin, une cible pour le déoxynivalénol et ses dérivés

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par certaines moisissures. Le déoxynivalénol (DON) produit par des souches de *Fusarium* est fréquemment rencontré dans les céréales en Europe. Le porc est exposé au DON qui est souvent produit avec deux dérivés acétylés, le 3 et le 15 acétyldéoxynivalénol (3-ADON et 15-ADON). Les autorités sanitaires considèrent que ces 3 composés ont des propriétés toxiques équivalentes. Ils ne font pas l'objet de réglementation spécifique au niveau européen.

L'épithélium intestinal est une barrière importante qui limite l'accès de xénobiotiques ou de pathogènes à l'ensemble de l'organisme. Les effets du DON sur l'intestin sont de mieux en mieux connus mais pas ceux de ses dérivés acétylés. Dans cette étude, à l'aide d'approches *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* nous avons comparé l'impact du DON, du 3 et du 15-ADON sur la prolifération des entérocytes et la fonction de barrière. Nous avons identifié des mécanismes moléculaires potentiellement impliqués.

Nos résultats montrent que ces mycotoxines altèrent différenciellement la prolifération des entérocytes, la fonction de barrière de l'épithélium intestinal en corrélation avec une diminution des protéines des jonctions serrées et une activation de certaines Mitogen Activated Protein kinases. Malgré leur structure chimique proche, ces toxines présentent des toxicités différentes. On peut les classer dans l'ordre suivant de toxicité croissante : 3-ADON ≤ DON < 15-ADON. Cette étude souligne la nécessité d'évaluer la contamination des céréales par les formes acétylées du DON en particulier par le 15-ADON et également le besoin d'approfondir les études toxicologiques comparées entre les dérivés du DON.

The intestine, a target for deoxynivalenol and its derivatives

Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi. Among the mycotoxins produced by *Fusarium* strains, deoxynivalenol (DON) is frequently encountered in cereals. Pig is exposed to DON-contaminated feed which is often produced with two acetylated derivatives, the 3 and the 15 acetyldeoxynivalenol (3-ADON and 15-ADON). Health authorities consider that these 3 toxins are equally toxic and thus, there is no specific regulation in Europe.

The intestinal epithelium is an important barrier that limits the access of xenobiotics or pathogens to the internal compartment. Knowledge of the DON effects on the intestine has been increasing but the effects of its derivatives are poorly documented. Using *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* approaches, we compared the impact of DON, 3 and 15-ADON on the proliferation of enterocytes and on the barrier function and we identified potential molecular mechanisms.

Our results show that these mycotoxins differentially alter the proliferation of enterocytes, the barrier function of intestinal epithelium in correlation with a decrease of tight junction protein expression and a modulation of Mitogen Activated Protein kinases. In spite of their similar chemical structure, these toxins exhibit different toxicities. They can be ranked in the following order of increasing toxicity: 3-ADON ≤ DON < 15-ADON. This study highlights the interest of evaluating the level of contamination of cereals by DON-acetylated forms, particularly of 15-ADON and of improving knowledge on their toxic effects.

INTRODUCTION

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par certaines moisissures qui peuvent contaminer l'alimentation destinée à l'homme ou aux animaux. En Europe, les conditions climatiques sont propices au développement sur les céréales de souches de *Fusarium*, susceptibles de produire du déoxynivalénol (DON). Le DON appartient à la famille des trichothécènes. Il contamine généralement les céréales et les produits dérivés. Il est le trichothécène le plus fréquemment détecté en Europe et dont les concentrations sont les plus élevées (Commission Européenne, 2003). Le DON est parfois produit simultanément avec deux dérivés acétylés le 3-acétyldéoxynivalénol (3-ADON) et le 15-acétyldéoxynivalénol (15-ADON) et cette co-contamination peut atteindre un niveau non négligeable dans les grains de maïs (Grosjean et Gourdain, 2010). La toxicité du DON est bien caractérisée (Pestka, 2010) et des limites maximales réglementaires ou des recommandations ont été déterminées pour l'alimentation humaine ou animale dans plus de 40 pays (FAO, 2004). Sur la base des données actuelles qui sont rares et parfois contradictoires, les autorités sanitaires considèrent aujourd'hui la toxicité du DON et de ses dérivés comme équivalente (EFSA, 2004 ; Union Européenne, 2005 ; FDA, 2010).

Parmi les espèces d'élevage, les porcs sont les plus sensibles au DON. Cette toxine affecte la prise alimentaire et la croissance, le système immunitaire, la reproduction mais aussi la fonction intestinale (Etienne, 2007). L'intestin est une barrière importante contre les contaminants alimentaires. L'ingestion de nourriture contaminée peut exposer les cellules épithéliales intestinales à des concentrations élevées de toxine (Maresca *et al.*, 2002). Chez le porc, nous avons récemment montré que le DON altère la morphologie (Kolf-Clauw *et al.*, 2009) et la fonction de barrière de l'intestin (Pinton *et al.*, 2009) Le mécanisme sous-jacent semble impliquer la voie de signalisation des Mitogen Activated Protein kinases (MAPK) et la modulation de certaines protéines des jonctions serrées (Pinton *et al.*, 2010).

L'objectif de la présente étude est, en utilisant des approches *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*, d'évaluer les effets toxiques comparés du DON, du 3-ADON et du 15-ADON sur l'intestin du porc et d'analyser les mécanismes sous-jacents impliqués.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Etude *in vivo* des effets des mycotoxines sur l'intestin

1.1.1. Animaux et aliments

L'expérience s'est déroulée dans les installations d'Arvalis-Institut du végétal (Villerable, France). 36 porcelets femelles et 36 porcelets mâles castrés (génétique : femelle Large White x Landrace / mâle Piétrain) ont été repartis 19 jours après sevrage (effectué à 21 jours) en 3 groupes de poids homogène. Ils ont ensuite été exposés durant 4 semaines à un aliment contrôle ou deux naturellement contaminés par les fusariotoxines. Deux lots de blé (sain ou fusarié) et un lot de maïs fusarié sélectionnés par ARVALIS-Institut du végétal ont permis de fabriquer 3 aliments expérimentaux. Le tableau 1 présente les ingrédients qui diffèrent selon les régimes et le niveau de contamination en mycotoxines. Les ingrédients communs aux 3 régimes (iso protéines et iso énergie) sont listés ci-dessous et exprimés en pourcentage : L-Lysine HCl (0,60), L-Thréonine (0,25), DL-Méthionine (0,18),

L-Tryptophane (0,042), Vitamines et pré-mélange minéral (4,0). La concentration en fusariotoxines a été déterminée par les laboratoires CAPINOV et LDA22 (Tableau 1).

Tableau 1 - Composition et contamination en mycotoxines des aliments

Régimes	Contrôle	DON	DON + 15-ADON
Ingrédients (%)			
Blé contrôle	72,44	31,65	46,51
Blé contaminé	0	40,00	0
Maïs contaminé	0	0	25,00
Tourteau de soja 48	20,49	21,30	21,90

Mycotoxines (µg/kg)

Déoxynivalénol (DON)	115	2290	1240
3-ADON	< 10	15	30
15-ADON	< 10	50	935
somme (DON+3-ADON+15-ADON)	115	2355	2205
Nivalénol	75	115	185
Diacétoxyscirpénol, toxine T2, toxine HT2	< 10	< 10	< 10
Zéaralénone	65	65	100
Fumonisines B1 + B2	10	10	< 10

1.1.2. Performances

La croissance des animaux, nourris à volonté, a été évaluée sur la durée totale de l'essai. Les refus d'aliment ont été pesés et la consommation d'aliment rapportée à un aliment contenant 87 % de matière sèche.

1.1.3. Impact de la présence de fusariotoxines sur la morphologie du jéjunum

Six animaux mâles de chaque groupe ont été euthanasiés par exsanguination en fin d'expérimentation. Des coupes de jéjunum de 2-4 µm en paraffine ont été colorées (hématoxyline et éosine) et observées au microscope équipé du système d'analyse d'images MOTIC Image Plus 2.0 M. La hauteur des villosités a été mesurée. Un score permettant d'évaluer les effets sur la morphologie et les lésions de l'intestin a été déterminé. Il inclut le nombre de villosités (0-3 points), la morphologie des entérocytes (0-3), le degré de coalescence des villosités (0-2), les aires de lyse et la présence d'œdème (0-2) ou de débris de nécrose et les cellules en apoptose (0-2).

1.2. Etude *ex vivo* des effets des mycotoxines sur le jéjunum

1.2.1. Animaux

Les expériences se sont déroulées dans les installations de Toxalim (INRA, Toulouse). Huit porcelets mâles castrés (PIC 410 X Camborough 15) sevrés à 21 jours ont été euthanasiés par exsanguination. Les explants préparés à partir de jéjunum ont ensuite été exposés à des toxines pures afin d'analyser les effets des toxines sur la morphologie et sur l'expression de différentes protéines.

1.2.2. Préparation des explants

Des segments de 20 cm de jéjunum ont été rincés dans du milieu de culture Williams E froid (Sigma, St Quentin Fallavier, France).

Après incision longitudinale, des explants de 6 mm de diamètre ont été découpés à l'aide de punches à biopsies puis traités dans des plaques multipuits.

1.2.3. Analyse de la morphologie

Les explants obtenus à partir des 8 animaux ont été déposés sur des éponges placées dans les plaques et incubés 4 h (39°C, 5% CO₂) dans du milieu complet de Williams E contenant 0 ou 10 µmol/L de DON, 3-ADON ou 15-ADON.

Des coupes de 2–4 µm en paraffine ont été colorées (hématoxyline et éosine) et analysées au microscope (Kolf-Clauw *et al.*, 2009) et les scores morphologiques et lésionnels déterminés selon les critères précédemment décrits. De 2 à 4 explants par animal et par traitement ont été analysés.

1.3. Etude *in vitro* des effets des toxines sur le jéjunum du porc

1.3.1. Culture cellulaire

Les cellules épithéliales intestinales porcines (IPEC-1) ont été cultivées dans du milieu DMEM-HAM F12 complet (Sigma) (Bouhet *et al.*, 2006). La différenciation des entérocytes en monocouche polarisée a été obtenue par culture sur inserts (Becton Dickinson, Pont de Claix, France) (Pinton *et al.*, 2009). Le DON, 3-ADON et 15-ADON (Sigma) ont été dissous dans du DMSO et stockés à -20°C avant dilution dans le milieu de culture.

Les échantillons contrôle ont été traités avec du DMSO.

1.3.2. Prolifération cellulaire

Les effets comparés de 24 h d'exposition à 10 µmol/L de DON, 3-ADON et 15-ADON sur la prolifération des cellules IPEC-1 ont été déterminés à l'aide du CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Ce test révèle la quantité d'ATP, proportionnelle au nombre de cellules. 4000 cellules par puits ont été mises en culture dans des plaques 96 puits (Greiner, Courtaboeuf, France).

A l'issue du traitement, 100 µl par puits de réactif CellTiter-Glo® ont été ajoutés, mélangés 2 minutes pour lyser les cellules.

Les données de fluorescence ont été collectées sur un lecteur de microplaques (Tecan, Lyon, France). Le bruit de fond a été obtenu par mesure de tous les réactifs en absence de cellules. 6 expériences indépendantes ont été réalisées.

1.3.3. Mesure de la perméabilité intestinale

Résistance électrique transépithéliale (TEER)

Les cellules IPEC-1, différenciées sur inserts ont été traitées avec 0 ou 10 µmol/L de DON, 3-ADON ou 15-ADON et le TEER (kΩ × cm²) a été mesuré 48 h après avec un Volt-ohmmètre Millicell-ERS (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Le TEER est un marqueur de l'intégrité de l'épithélium. 7 expériences indépendantes ont été réalisées.

Passage d'un traceur de flux paracellulaire

Les cellules ont été traitées comme dans l'expérience précédente. Après 48 h de culture, le dextran-FITC (Sigma) a été ajouté dans le compartiment cellulaire apical (concentration finale : 2,2 mg/mL).

Après 1 h d'incubation, la quantité de fluorescence a été mesurée dans le compartiment basal avec un fluorimètre lecteur de microplaques (Tecan) aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission suivantes : 490 et 520 nm. Le bruit de fond a été obtenu par mesure de puits contenant tous les réactifs en absence de cellules.

7 expériences indépendantes ont été réalisées.

1.3.4. Extraction des protéines, SDS-PAGE et immunoblotting

Les cellules ont été différenciées puis traitées avec 0 ou 10 µmol/L de DON, 3-ADON ou 15-ADON pour analyser l'expression des protéines de jonction serrées ou des MAPK. Les protéines ont été extraites et quantifiées (Pinton *et al.*, 2009). Trois à 4 expériences indépendantes ont été réalisées. 15 µg de protéines totales ont été séparées sur SDS-PAGE (12.5 %) et incubées avec les anticorps anti-claudine-3 ou anti-claudine-4 (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA), phospho-ERK, phospho-p38 et phospho-JNK (Cell Signaling Technology Danvers, MA) à 4°C durant la nuit. Une incubation de 30 min à 20°C avec l'anticorps secondaire CFTM770 anti IgG (Biotium, Hayward, CA, USA) a permis de révéler le signal.

Les membranes ont été analysées avec l'appareil d'imagerie infrarouge Odyssey (LI-COR-ScienceTec, Les Ulis, France). L'intensité de fluorescence a été déterminée à l'aide du logiciel d'analyse d'images LI-COR-Imaging après correction du bruit de fond. L'expression des protéines a été estimée après normalisation calculée par le ratio de l'intensité des bandes d'intérêt et de la bande de β-actine révélée par l'anti β-actine (Cell Signaling Technology).

1.4. Analyses statistiques

Les données obtenues dans les différentes études (moyenne ± écart-type sauf précision) ont été analysées par ANOVA suivie d'un test PLSD Fisher après vérification de l'homoscédasticité. Des valeurs de P < 0,05 sont considérées significatives.

2. RESULTATS

2.1. Effet de la présence de DON et de 15-ADON dans l'aliment sur les performances zootechniques

Le tableau 2 montre une diminution de la consommation d'aliment par les animaux des groupes R2 et R3 se traduisant par une diminution du gain moyen quotidien mais sans influence sur l'indice de consommation.

Tableau 2 - Effet du régime alimentaire sur les performances (entre J41 et J69) et la structure de l'intestin.

	contrôle (R1)	DON (R2)	DON + 15-ADON (R3)
Consommation moyenne journalière (g/j)	980 ± 91 (a)	880 ± 87 (b)	871 ± 157 (b)
Gain moyen quotidien (g/j)	617 ± 59 (a)	564 ± 55 (b)	561 ± 99 (b)
Indice de consommation	1,59 ± 0,06	1,56 ± 0,06	1,55 ± 0,07
Hauteur des villosités du jéjunum (µm)	374 ± 47 (a)	336 ± 34 (a)	275 ± 36 (b)
Score morphologique	5,7 ± 0,5	5,5 ± 0,5	5,2 ± 0,4
Score lésionnel	5,8 ± 0,4	4,2 ± 1,6	3,3 ± 0,6
Score histologique total	11,3 ± 0,5 (a)	9,7 ± 1,9 (a)	8,2 ± 2,3 (b)

Les moyennes (± écarts-types) sans lettre commune sont différentes (P<0,05).

2.2. Effet de la présence de DON et de 15-ADON dans l'aliment sur la morphologie de l'intestin

Nous avons observé une réduction significative de la hauteur des villosités du jéjunum dans le groupe R3 (- 18%) alors que le DON seul n'a eu aucun impact. Par ailleurs dans ce même groupe, des effets délétères sur la morphologie et des lésions de l'intestin ont été mis en évidence comme en témoigne la diminution du score histologique total (Tableau 2).

Ces résultats montrent que la présence de 15-ADON dans l'aliment altère la structure de l'intestin.

2.3. Effets comparés du DON, 3-ADON et 15-ADON lors d'une exposition d'explants de jéjunum

Pour comparer les effets du DON et des dérivés acétylés sur l'intestin, nous avons quantifié la morphologie et les lésions observées après une exposition de courte durée d'explants de jéjunum. Nous avons observé une diminution du score total de 48 %, 53% et 73% pour le 3-ADON, le DON et le 15-ADON respectivement (Tableau 3). La présence de villosités aplaties et coalescentes, de zones de lyse, d'œdème et d'apoptose a été particulièrement importante dans les explants exposés au 15-ADON. Ainsi, malgré leur structure chimique très proche, le DON, 3-ADON et 15-ADON n'entraînent pas les mêmes effets sur le tissu intestinal.

Tableau 3 - Scores moyens obtenus à partir de 8 animaux (2 à 4 explants/animal).

Traitement	score morphologique	score lésionnel	score histologique total
Contrôle	4,4 ± 0,4	3,9 ± 0,6	8,3 ± 0,8 (a)
3-ADON	2,3 ± 1,3	2,0 ± 0,6	4,3 ± 1,7 (b, c)
DON	2,2 ± 1,1	1,7 ± 0,6	3,9 ± 1,7 (c)
15-ADON	0,7 ± 0,4	1,5 ± 0,7	2,2 ± 1,1 (d)

Les valeurs sans lettre commune sont différentes ($P < 0,05$).

2.4. Effets comparés du DON, 3-ADON et 15-ADON sur les cellules épithéliales intestinales

Pour compléter ces résultats, nous avons étudié l'impact des toxines sur les cellules épithéliales intestinales en culture. Nous avons tout d'abord évalué les effets comparés sur la prolifération cellulaire, paramètre clé du renouvellement des entérocytes de l'épithélium intestinal. Lors d'une exposition de 24 h à la dose non cytotoxique de 10 $\mu\text{mol/L}$, nous avons mis en évidence un impact différentiel des toxines par une réduction de la prolifération des cellules de 13 % (non significatif), 60 % ($P < 0,0001$) et 69 % ($P < 0,0001$) pour le 3-ADON, le DON et le 15-ADON respectivement (Figure 1).

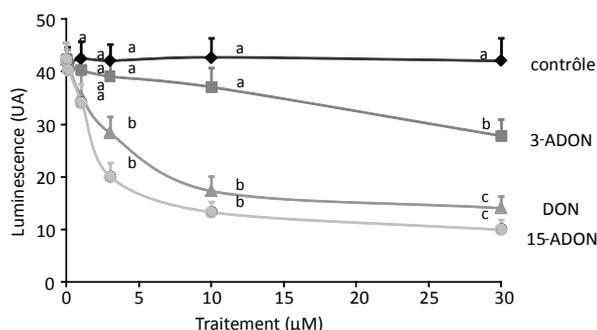


Figure 1- Effet d'une exposition de 24 h aux toxines sur la prolifération cellulaire (moyenne ± erreur standard).

Les valeurs sans lettre commune sont différentes ($P < 0,05$).

Le DON augmente de façon dose-dépendante la perméabilité paracellulaire d'explants de jéjunum traités dans des chambres d'Ussing et de cellules différenciées cultivées dans des inserts (Pinton *et al.*, 2009). Nous avons utilisé ce modèle cellulaire pour évaluer les effets du DON et de ses dérivés sur la fonction de barrière. Les cellules différenciées ont été exposées durant 24 h à 10 $\mu\text{mol/L}$ de 3-ADON, DON ou 15-ADON. La fonction de barrière a alors été évaluée par la mesure du TEER (Figure 2). Aucun effet n'a été observé pour le 3-ADON. Le TEER des cellules exposées au DON a diminué de 8 % (non significatif) alors qu'une diminution de 75 % ($p = 0,004$) a été observée après le traitement au 15-ADON. Ces résultats ont été confirmés par la mesure du passage paracellulaire de dextran-FITC au travers des monocouches de cellules différenciées. L'exposition à 10 $\mu\text{mol/L}$ de 3-ADON et de DON n'a pas modifié la perméabilité paracellulaire des cellules qui a en revanche été multipliée par 6 ($P < 0,0001$) lorsque les cellules ont été exposées au 15-ADON.

Ces résultats montrent que lorsque les cellules sont exposées à de faibles doses de toxine, la fonction de barrière est altérée avec le 15-ADON alors que l'exposition au DON et au 3-ADON n'induit pas d'effet significatif.

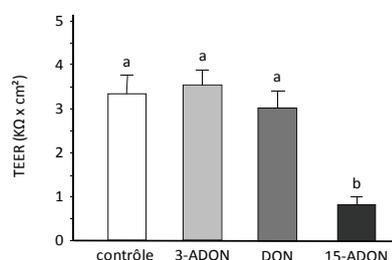


Figure 2 - Effet d'une exposition de 24 h à 10 $\mu\text{mol/L}$ de chaque toxine sur la résistance électrique transépithéliale (moyenne ± erreur standard).

Les valeurs sans lettre commune sont différentes ($P < 0,05$).

2.5. Mécanismes d'action des toxines

Le DON active les MAPK qui modulent l'expression des protéines de jonction serrées claudine-3 et claudine-4 en corrélation avec une diminution de la fonction de barrière (Pinton *et al.*, 2009, 2010 ; Van De Walle *et al.*, 2010).

Nous avons comparé l'impact du DON et de ses dérivés sur l'expression des protéines des jonctions serrées et des MAPK. Nos expériences ont montré qu'une exposition de 48 h à 10 $\mu\text{mol/L}$ de 3-ADON ou de DON entraîne une diminution comprise entre 10 et 15% de l'expression de claudine-3 et claudine-4. En revanche, avec 10 $\mu\text{mol/L}$ de 15-ADON la diminution de l'expression de la claudine-3 atteint 43 % ($P = 0,012$) et celle de la claudine-4 atteint 34% ($P = 0,007$) (Figure 3). Ces résultats montrent que le 15-ADON, affecte significativement l'expression des claudines 3 et 4 des cellules épithéliales intestinales en corrélation avec l'augmentation de perméabilité paracellulaire.

Nous avons ensuite cherché à vérifier si la modulation différentielle des claudines par le 15-ADON était corrélée à un niveau d'activation différentiel de la voie de signalisation des MAPK (Figure 4). Nous avons mis en évidence une augmentation d'un facteur 2,5 du niveau d'expression de ERK par le DON et ses dérivés sans différence significative entre les toxines. En revanche, des différences significatives ont été observées pour p38 et JNK. Pour p38, l'augmentation a été de 4,1 ($P = 0,02$), 3,3 ($P = 0,0013$) et 5,2 fois ($P < 0,0001$) lors de l'exposition au 3-ADON, DON and 15-ADON respectivement.

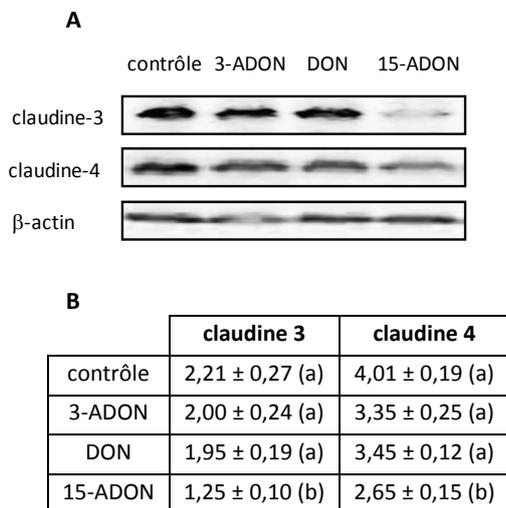


Figure 3 - Effet d'une exposition de 48 h à 10 μ mol/L de DON et ses formes acétylées sur le niveau d'expression des protéines de jonction évaluée par western blot (panel A) et quantifiée (moyenne \pm erreur standard) (tableau B).

Les valeurs sans lettre commune sont différentes ($P < 0,05$).

Pour JNK, elle a été de 2,7 ($P = 0,013$), 3,7 ($P = 0,004$) et 5,8 fois ($P < 0,0001$) dans les mêmes conditions.

Cette capacité du 15-ADON à induire différenciellement l'activation des MAPK en comparaison avec le 3-ADON et le DON suggère un mécanisme d'action spécifique de cette toxine.

3. DISCUSSION

Cette étude avait pour objectif d'évaluer les effets toxiques comparés du DON, du 3-ADON et du 15-ADON sur l'intestin du porc et d'analyser les mécanismes sous-jacents impliqués en utilisant des approches *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*.

Dans un essai réalisé *in vivo*, les performances des animaux ont été mesurées afin d'analyser l'impact du 15-ADON sur les performances. Comme il était impossible de disposer d'un aliment monocontaminé par le 15-ADON, nous avons comparé les effets de deux aliments (R2 et R3) dont la somme (DON + 3-ADON + 15-ADON) était de même niveau ; la contamination de l'aliment R3 étant due pour moitié au DON et pour moitié au 15-ADON. Nous avons confirmé les effets négatifs du DON sur la consommation moyenne journalière et le gain moyen quotidien (Etienne, 2007). De plus, la comparaison des deux groupes d'animaux recevant de l'aliment contaminé montre que la présence de 15-ADON dans le régime n'induit pas d'effet spécifique sur les performances.

Cependant, malgré l'absence de différences dans la mesure des paramètres zootechniques, nous avons mis en évidence des effets liés à la présence de 15-ADON dans l'aliment sur l'histologie et la fonction de barrière de l'intestin. L'épithélium intestinal joue un rôle important de barrière contre les contaminants alimentaires et les pathogènes présents dans le lumen. Lorsque son intégrité est perturbée, la translocation de microorganismes ou de xénobiotiques peut générer des dommages pour la santé (Arrieta *et al.*, 2006 ; Oswald, 2006). Peu d'études ont comparé les effets du DON et des dérivés sur l'intestin. Forsell *et al.* (1987) ont montré chez la souris que le 15-ADON est plus toxique que le DON lorsqu'il est ingéré en comparaison avec une injection péritonéale, suggérant un rôle potentiel de l'intestin comme cible de ces toxines.

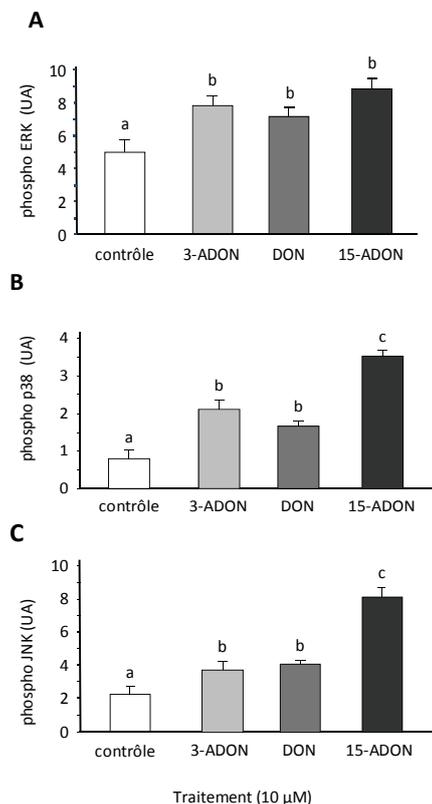


Figure 4 - Effet d'une exposition de 1 h à 10 μ mol/L de DON et ses formes acétylées sur le niveau d'expression des MAPK par western blot. ERK (panel A), p38 (panel B) et JNK (panel C) (moyenne \pm erreur standard).

Les valeurs sans lettre commune sont différentes ($P < 0,05$).

Pour réaliser notre étude chez le porc, l'une des espèces les plus sensibles aux fusariotoxines, nous avons utilisé 3 approches complémentaires. Une exposition des animaux à de l'aliment contaminé a permis de confirmer les effets du DON sur la réduction de la prise alimentaire et de mettre en évidence l'impact délétère du 15-ADON sur la structure de l'intestin. Nous avons ensuite utilisé des explants de jéjunum maintenus en culture pour mettre en évidence l'effet du DON sur la perméabilité paracellulaire et confirmer que le 15-ADON induit des lésions plus importantes de l'épithélium intestinal que le DON et 3-ADON. La dose de 10 μ mol/L utilisée correspond environ à 3,3 mg de toxine par kg d'aliment (Pinton *et al.*, 2009). Cette étude a été complétée en utilisant des cellules intestinales porcines ; les effets différentiels des toxines ont été analysés sur les entérocytes en prolifération puis sur les cellules différenciées.

L'ensemble des données obtenues permet de classer les toxines dans l'ordre de toxicité croissante suivant : 3-ADON < DON < 15-ADON. Dans la littérature, les effets comparés du DON et de ses dérivés acétylés sont peu décrits et on note des différences selon le modèle, la dose et le paramètre étudié. La prolifération des lymphocytes humains (Berek *et al.*, 2001) et murins (Bondy *et al.*, 1991) est réduite en présence de DON par rapport au 3-ADON. Dans les fibroblastes 3T3 de souris, les toxines sont classées par ordre de toxicité croissante : 3ADON \leq DON = 15ADON (Sundstol Eriksen et Pettersson, 2004). Une étude récente montre que dans des cellules intestinales d'origine humaine, le 15-ADON et le DON ont une toxicité supérieure au 3-ADON (Yang *et al.*, 2010). Nos résultats nous ont permis de classer les toxines pour leurs effets toxiques sur la prolifération cellulaire dans l'ordre suivant : 3ADON < DON < 15ADON et pour leurs effets sur

la fonction de barrière, l'expression des claudines et des MAPK dans l'ordre suivant : 3ADON=DON<15ADON. L'effet exacerbé du 15-ADON sur l'activation des MAPK pourrait avoir des conséquences sur l'homéostasie du tissu intestinal. En effet, les MAPK sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires (Cobb, 1999). Des modifications de leur niveau d'expression pourraient réguler différemment les fonctions des cellules de l'intestin et entraîner des dysfonctionnements dans la fonction de barrière ou la modulation des cytokines avec des conséquences sur les réponses inflammatoires ou anti-inflammatoires. Plusieurs hypothèses en relation avec la conformation de chacun des composés peuvent expliquer les effets toxiques différentiels observés. La position du groupement acétyl peut influencer la cinétique de transport ou l'efflux des toxines au niveau des cellules intestinales.

La nature des interactions entre le ribosome et les toxines pourrait être différente en entraînant des modulations des cascades moléculaires mises en jeu dans les réponses des cellules.

En conclusion, nos résultats montrent que lorsqu'on classe le DON et ses dérivés acétylés selon leur toxicité pour le tissu intestinal, le 15-ADON exerce les effets les plus délétères.

Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux connaître les effets sur les fonctions intestinales des trichothécènes et en particulier du 15-ADON.

Cela est d'autant plus utile que les gestionnaires du risque considèrent aujourd'hui que le DON et ses dérivés acétylés ont une toxicité équivalente (EFSA, 2004 ; Union Européenne, 2005 ; FDA, 2010).

En complément, des efforts devront être faits pour mieux évaluer la prévalence des formes acétylées du DON dans les matières premières et les aliments pour animaux à l'aide de méthodes de dosage fiables qui restent à développer.

REMERCIEMENTS

Cette étude a bénéficié des financements des projets Mycored (Europe, FP7-KBBE-2007-2A), DON & Co (France, ANR-CESA, 2011-2014), CAPES-COFECUB (France-Brésil, 593/08), CNPq (Brésil, 301629/08) et de la fondation Araucaria (Brésil, 419/2009).

Les auteurs remercient Fabien SKIBA (Arvalis - Institut du végétal) pour la lecture du manuscrit et ses suggestions.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arrieta M. C., Bistriz L., Meddings J. B., 2006. Alterations in intestinal permeability. *Gut*, 55, 1512-1520.
- Berek L., Petri I.B., Mesterhazy A., Teren J., Molnar J., 2001. Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. *Toxicol In Vitro*, 15, 25-30.
- Bondy G.S., McCormick S.P., Beremand M.N., Pestka J. J., 1991. Murine lymphocyte proliferation impaired by substituted neosolaniols and calonecetrins–Fusarium metabolites associated with trichothecene biosynthesis. *Toxicol*, 29, 1107-1113.
- Bouhet S., Le Dorze E., Peres S., Fairbrother J. M., Oswald, I. P., 2006. Mycotoxin fumonisin B1 selectively down-regulates the basal IL-8 expression in pig intestine: in vivo and in vitro studies. *Food Chem Toxicol*, 44, 1768-1773.
- Cobb M. H., 1999. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol*, 71, 479-500.
- Commission Européenne, 2003. SCOOP. Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. <http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf>. 2003; Accessed July 29. 2011
- EFSA, 2004. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed (Question N° EFSA-Q-2003-036) Adopted on 2 June 2004. *The EFSA Journal*, 73, 1-41.
- Etienne M., 2007. Effets biologiques et physiologiques d'une mycotoxine, le déoxynivalénol (DON), chez le porc. *Journées Recherche Porcine en France*, 39, 407-418.
- FAO, 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. *FAO Food and Nutrition*, Paper 81.
- FDA, 2010. Guidance for Industry and FDAi Advisory Levels for Deoxynivalenol (DON) in Finished Wheat Products for Human Consumption and Grains and Grain By-Products used for Animal Feed US Department of Health and Human Services Center for Food Safety and Applied Nutrition FDA, June 2010.
- Forsell J. H., Jensen R., Tai J. H., Witt M., Lin W. S., Pestka, J. J., 1987. Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol (vomitoxin) and 15-acetyldeoxynivalenol in the B6C3F1 mouse. *Food Chem Toxicol*, 25, 155-162.
- Grosjean F., Gourdain E., 2010. Mycotoxines dans les céréales : gestion des risques. *Techniques de l'ingénieur*, F 1 138.
- Kolf-Clauw M., Castellote J., Joly B., Bourges-Abella N., Raymond-Letron I., Pinton P., Oswald, I. P., 2009. Development of a pig jejunal explants culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: histopathological analysis. *Toxicol In Vitro*, 23, 1580-1584.
- Maresca M., Mahfoud R., Garmy N., Fantini J., 2002. The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells. *J Nutr*, 132, 2723-2731.
- Oswald I. P., 2006. Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defense of the pig intestine. *Vet Res*, 37, 359-368.
- Pestka J. J., 2010. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch Toxicol*, 84, 663-679.
- Pinton P., Nougayrede J. P., Del Rio J. C., Moreno C., Marin D. E., Ferrier L., Bracarense A. P., Kolf-Clauw M., Oswald, I. P., 2009. The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicol Appl Pharmacol*, 237, 41-48.
- Pinton P., Braicu C., Nougayrede J. P., Laffitte J., Taranu I., Oswald, I. P., 2010. Deoxynivalenol Impairs Porcine Intestinal Barrier Function and Decreases the Protein Expression of Claudin-4 through a Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Mechanism. *J Nutr*, 140, 1956-1962.
- Sundstol Eriksen G., Pettersson H., 2004. Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed *Animal Feed Science and Technology*, 114, 205-239.
- Union Européenne, 2005. Règlement (CE) N° 856/2005 de la commission du 6 juin 2005.
- Van De Walle J., Sergent T., Piront N., Toussaint O., Schneider Y. J., Larondelle Y., 2010. Deoxynivalenol affects in vitro intestinal epithelial cell barrier integrity through inhibition of protein synthesis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 245, 291-298
- Yang H., Park S. H., Choi H. J., Do K. H., Kim J., An T. J., Lee, S. H., Moon Y., 2010. Mechanism-based alternative monitoring of endoplasmic reticulum stress by 8-keto-trichothecene mycotoxins using human intestinal epithelial cell line. *Toxicol Lett*, 198, 317-323.