

# Les explants intestinaux de porc: un modèle original pour analyser les effets des mycotoxines

Philippe PINTON, Alix PIERRON, Sabria MIMOUN, Delphine PAYROS, Joëlle LAFFITTE, Anne-Marie COSSALTER, Yannick LIPPI, Pascal GOURBEYRE, Isabelle P. OSWALD.

INRA, UMR1331, Toxalim, Unité de Toxicologie alimentaire, 31027 Toulouse, France

Philippe.pinton@toulouse.inra.fr

## Les explants intestinaux de porc : un modèle original pour analyser les effets des mycotoxines

L'intestin, site majeur d'absorption des nutriments, est la première barrière lors de l'ingestion de contaminants alimentaires. Les mycotoxines, métabolites toxiques produits par des champignons, sont des contaminants naturels des céréales ; le porc y est exposé par son alimentation. Il est très sensible à la présence de déoxynivalénol (DON), produit par *Fusarium*. Afin d'étudier les effets du DON sur l'intestin du porc, nous avons développé un modèle d'explants intestinaux.

A partir de segments d'intestin de porcelets, des explants de 6 mm de diamètre ont été réalisés et exposés à 5 µM ou 10 µM de DON pour une durée de 1h à 12h, dans des plaques de culture. Conditionnés dans du fixateur ou congelés, ils ont été utilisés pour des études histologiques et d'expression des gènes ou des protéines. Nous avons ainsi montré que le DON (i) altère la morphologie de l'épithélium intestinal, (ii) module dans le temps et le long de l'axe proximo-distal de l'intestin l'expression de gènes de la réponse immune pro-inflammatoire et (iii) active les voies de signalisation des Mitogen-Activated Protein Kinases. Les résultats obtenus sont en accord avec les données obtenues *in vivo* ou *in vitro*.

Les explants intestinaux permettent de tester simultanément plusieurs dizaines de conditions expérimentales en utilisant des approches histologiques, biochimiques et moléculaires. Ils représentent un système d'étude intermédiaire entre les expérimentations sur animaux et la culture cellulaire. Ils constituent un outil original permettant d'analyser les effets sur l'intestin de contaminants, d'additifs ou de constituants alimentaires, tout en répondant aux exigences de réduction, de raffinement et de remplacement qui entourent l'utilisation d'animaux à des fins expérimentales.

## The pig intestinal explants: an original model for the analysis of the effects of mycotoxins

The intestine, the major site for nutrient absorption is the first barrier following the ingestion of food contaminants. Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi and contaminating cereals. The pig is exposed to contaminated feed and is very sensitive to deoxynivalenol (DON), a toxin produced by *Fusarium*. To study the effects of DON on the pig intestine, we developed a model of intestinal explants.

From a segment of pig intestine, explants of 6 mm diameter were prepared and exposed to 5 µM or 10 µM of DON for 1 to 12 h, in cell culture plates. Stored in fixative solution or frozen, the explants were then used for histological study and for studying the gene or protein expression. We demonstrated that DON (i) alters the morphology of the intestinal epithelium, (ii) modulates, depending on time and along the proximo-distal axis of the intestine, the expression of gene coding for pro-inflammatory cytokines (iii) activates the Mitogen-Activated Protein Kinases signaling pathway. These data were correlated with *in vivo* and *in vitro* experiments.

Intestinal explants allow dozens of experimental conditions to be tested simultaneously with histological, biochemical and molecular approaches. They are a complementary approach to *in vivo* experiments and to cell culture models and an original tool for studying the effects on the intestine of food contaminants, additives or food components. At the same time, they represent an alternative that satisfies the requirements to reduce, refine and replace laboratory animal-based research.

## INTRODUCTION

Les moisissures sont des contaminants naturels capables de coloniser de nombreux substrats dès lors que les conditions écologiques (température, eau disponible, taux d'oxygène, compétition avec d'autres microorganismes) sont favorables. Les céréales, qui représentent une fraction importante de la ration alimentaire du porc, sont particulièrement concernées par la contamination fongique qui peut avoir lieu au champ ou lors du stockage. Les moisissures produisent certains métabolites secondaires toxiques, les mycotoxines.

Une enquête récente a montré que sur plus de 11000 échantillons d'aliments destinés aux animaux, environ 70% étaient contaminés à un niveau détectable et 38% contenaient au moins deux mycotoxines (Streit *et al.*, 2013).

Dotés de structures chimiques très variées et résistants à la dégradation, ces contaminants alimentaires ont des effets délétères divers dans les espèces d'élevage qui vont de la réduction des performances à l'immunosuppression, la baisse de fertilité, voire la mort des 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 est le trichothécène le plus fréquemment détecté en Europe et dont les concentrations sont les plus élevées dans les céréales et les produits dérivés. La contamination mondiale par le DON varie selon les années et les régions et est généralement faible (concentrations inférieures à 1 mg/kg) mais elle peut ponctuellement atteindre 5 à 20 mg/kg dans certaines farines de maïs (Abouzed *et al.*, 1991).

Des cas d'intoxication à la suite de l'ingestion de denrées contaminées par des trichothécènes dont le DON, ont été rapportés chez l'homme ou l'animal. Les symptômes fréquemment décrits sont des nausées, vomissements et divers troubles gastro-intestinaux (Pinton et Oswald, 2014).

L'intestin représente le site majeur d'exposition aux polluants, aux toxines et aux pathogènes présents dans la nourriture ou l'eau et constitue la première barrière lors de l'ingestion d'aliments contaminés. Il comprend l'œsophage, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon), le gros intestin (caecum, colon) puis le rectum. L'intestin grêle est le site d'absorption majoritaire des nutriments ou des toxines.

La paroi de l'ensemble du tube digestif présente une organisation caractéristique constituée de quatre tuniques successives qui sont, à partir de la lumière : la muqueuse, la sous muqueuse, la musculuse et la séreuse. La séreuse, en continuité avec le mésentère adhère à la musculuse qui est constituée de deux couches de fibres musculaires lisses. La sous-muqueuse est composée d'un tissu conjonctif lâche qui permet le glissement de la muqueuse par rapport à la musculuse. Elle abrite un riche réseau sanguin et lymphatique.

D'un segment intestinal à l'autre, la muqueuse garde la même structure constituée de trois couches successives : la *muscularis mucosae* formée de deux couches musculaires, la *lamina propria* formée d'un tissu conjonctif chargé en lymphocytes et polynucléaires et enfin l'épithélium.

La nature des cellules qui composent l'épithélium (entérocytes, cellules caliciformes ou cellules endocrines notamment) peut varier d'une région à l'autre de l'intestin grêle.

C'est l'épithélium intestinal qui assure la fonction de barrière de l'intestin. Il agit comme une barrière physique et possède des capacités d'absorption et de métabolisation des nutriments voire des contaminants et il participe à la réponse immunitaire locale (Shimizu, 2010). Un processus de prolifération / différenciation des cellules intestinales à partir de cellules souches localisées dans le fond des cryptes permet la régénération continue de l'épithélium intestinal (Booth et Potten, 2000). Arrivées au sommet des villosités, les cellules meurent d'apoptose et sont éliminées dans la lumière de l'intestin.

Le tractus gastro-intestinal est un organe complexe constitué de différentes structures et de nombreux types cellulaires. Les approches *in vitro* de culture cellulaire utilisées pour l'étude des effets de xénobiotiques sur l'intestin ne permettent pas de reproduire la structure de ce tissu. La culture d'explants offre une alternative qui permet de prendre en compte la complexité du tissu et les interactions entre différents types cellulaires. Cet outil permet également de réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation, répondant à la démarche éthique des 3R (Russel et Burch, 1959).

Afin d'évaluer les effets du DON sur l'intestin de porc, nous avons utilisé ce modèle d'explants pour une étude globale de la modulation du transcriptome à l'aide de puces à ADN. Par ailleurs, nous présentons également les résultats d'études précédentes qui permettent d'apprécier l'effet du DON sur la morphologie de l'intestin et sur l'expression de gènes et de protéines (Cano *et al.*, 2013 ; Luciola *et al.*, 2013).

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Animaux

Les expérimentations ont eu lieu dans les installations de l'unité Toxalim (INRA, Toulouse) sur des porcelets post sevrés qui permettent de générer des explants de bonne qualité (Kolf-Clauw *et al.*, 2009). Huit animaux ont été anesthésiés par électroanesthésie puis euthanasiés par exsanguination avant le prélèvement d'échantillons de différents segments de l'intestin.

### 1.2. Préparation des explants

Des segments d'intestin de 10 cm 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 déposés sur des éponges placées dans des plaques multipuits. Un minimum de quatre explants par animal et par traitement ont été incubés à 39°C et 5% CO<sub>2</sub> dans du milieu complet de Williams E. Le DON (Sigma), dilué dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), a été rajouté au milieu de culture, une concentration identique de DMSO ayant été rajoutée au milieu des explants contrôle. Les explants ont été exposés à une concentration de toxine de 5 µM ou 10 µM, qui représente un niveau plausible auquel peut être exposée la muqueuse intestinale des animaux ayant consommé un aliment naturellement contaminé (Sergent *et al.*, 2006). Selon les expériences, les temps d'exposition ont été de 1h, 4h, 8h ou 12h. En fin d'expérimentation, les explants ont été soit conditionnés dans du fixateur pour des études morphologiques, soit congelés dans l'azote liquide pour l'étude de l'expression des gènes ou des protéines.

### 1.3. Analyse des effets des toxines sur la morphologie de l'épithélium intestinal

Les explants fixés dans du formaldéhyde 4% ont été inclus dans de la paraffine. Des coupes de 2 à 4 µm colorées à l'hématoxyline-éosine ont été observées et analysées au microscope et un score histologique a été déterminé selon les critères morphologiques et lésionnels précédemment décrits (Kolf-Clauw *et al.*, 2009). La diminution du score total, qui combine les scores morphologiques et lésionnels, révèle une dégradation de l'épithélium.

### 1.4. Analyse de l'expression des gènes

Les ARN totaux ont été purifiés par la méthode d'extraction au phénol-chloroforme, dosés au spectrophotomètre et rétrotranscrits en ADN complémentaire (ADNc) avant d'être utilisés pour étudier l'expression des gènes (Cano *et al.*, 2013).

#### 1.4.1. Analyse par PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Cinq ng d'ADNc ont été utilisés dans les réactions de qPCR, afin de quantifier de manière relative l'abondance des transcrits présents dans les échantillons. Au cours des cycles de la PCR, la fluorescence du SYBRgreen, un colorant qui se fixe au petit sillon des molécules d'ADN, est collectée. Plus l'échantillon est riche en transcrits d'intérêt, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. L'expression des gènes a été normalisée par rapport à celle de deux gènes de référence pour lesquels le traitement ne modifie pas le niveau d'expression.

#### 1.4.2. Analyse par puce à ADN

Les puces à ADN (ou microarrays) sont constituées d'ensembles d'oligonucléotides de 60 bases (appelés sondes), déposés sur lame de verre sous forme de spots et dont les séquences sont spécifiques des transcrits du génome. Ainsi une lame peut contenir près de 60000 spots permettant de représenter l'ensemble des gènes. Les ARNs des échantillons à tester (cibles) sont marqués par un fluorochrome puis hybridés sur les puces. L'intensité du signal observé pour chaque spot révèle l'abondance du transcrit correspondant spécifiquement hybridé. Les valeurs de fluorescence sont traitées pour filtrer les valeurs aberrantes ou ne présentant pas de signal et sont ensuite normalisées, permettant ensuite d'appliquer des tests statistiques dans le but d'identifier des gènes différentiellement exprimés.

Nous avons utilisé la puce Agilent Porcinet 60K\_DEC2011 qui comprend 62976 sondes dont environ 1300 sont des contrôles positifs et négatifs. L'ARN de chaque échantillon a été rétrotranscrit par transcription réverse (RT) à l'aide d'amorces oligodT. Les échantillons d'ADNc obtenus ont ensuite servi de matrice à une transcription *in vitro* (production d'ARN copie ou cRNA) durant laquelle du désoxycytidine triphosphate (dCTP) marqué à la Cyanine-3 (Cy3) a été incorporé. Les cRNA ainsi produits ont été hybridés sur les puces. Après lavage, les lames ont été scannées (Agilent G2505C) pour collecter le signal provenant de chaque sonde. Toutes les étapes ont été réalisées sur un plateau technique GeT-TRiX (INRA-Toulouse) en utilisant le protocole Agilent (Ref G4140-90040). Une analyse des fichiers issus du logiciel Feature Extraction a été conduite sous l'environnement R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org), R v. 3.0.1) en utilisant des packages de Bioconductor ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org), v 2.12, (Gentleman *et al.*, 2004)).

### 1.5. Analyse de l'expression des protéines

Les protéines ont été purifiées et dosées (Pinton *et al.*, 2009).

Quinze µg de protéines totales ont été séparées sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE 12,5 %), transférées sur membrane et incubées avec les anticorps dirigés contre les Mitogen-activated Protein kinase (MAPK) phospho-ERK, phospho-p38, phospho-JNK et la β-actine (Cell-Signaling, Danvers, MA) puis révélées par l'anticorps secondaire CFTM770 anti IgG (Biotium, Hayward, CA, USA) émettant dans le proche infrarouge.

L'intensité de fluorescence a été mesurée à l'aide d'un appareil d'imagerie infrarouge Odyssey et du logiciel d'analyse d'images LI-COR-Imaging (LI-COR-ScienceTec, Les Ulis, France).

Après correction du bruit de fond, l'expression des MAPK a été normalisée par rapport à celle de la β-actine.

### 1.6. Analyses statistiques

Les résultats des analyses morphologiques, des expériences de PCR en temps réel et de Western blot ont été analysés par ANOVA, test de Fisher et de Student à l'aide du logiciel Statview software, version 5.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA).

Concernant les puces à ADN, les gènes différentiellement exprimés ont été identifiés après analyse par un test t par séries appariées sous l'environnement R, en utilisant le package limma. Une classification ascendante hiérarchique sur les sondes a été générée dans le but de classer les gènes en groupes ayant un comportement similaire sur la base de la corrélation des signaux. Une matrice 2D en couleurs a permis de représenter la classification des sondes (lignes) et des conditions (colonnes).

Les valeurs de P inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives.

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

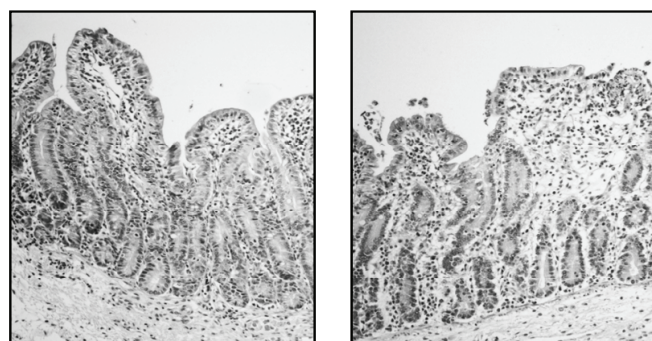
### 2.1. Effets du DON sur la morphologie de l'épithélium intestinal

L'analyse histomorphologique de coupes d'explants a permis d'évaluer l'impact du DON sur l'épithélium intestinal.

Des villosités aplaties et coalescentes, des zones de lyse, d'œdème et d'apoptose ont été observées (Figure 1a). La détermination des scores morphologiques et lésionnels révèle une diminution du score total de 50% pour les explants exposés au DON par rapport aux explants contrôle (Figure 1b). Au cours d'une expérimentation *in vivo* durant laquelle des porcs ont reçu un aliment contaminé par du DON à 3 mg/kg d'aliment, des altérations morphologiques de l'épithélium similaires ont été observées (atrophie et fusion des villosités et diminution de la hauteur des villosités et de la prolifération cellulaire) (Bracarense *et al.*, 2012).

Ces effets observés à la suite d'une exposition courte au DON concordent avec les lésions nécrotiques du tractus gastro-intestinal rapportées dans des études de toxicité chronique ou aiguës (Pestka et Smolinski, 2005). Ces lésions confirment que le DON affecte l'intégrité de l'épithélium intestinal et valident l'intérêt de l'utilisation du modèle d'explants pour étudier l'effet des mycotoxines sur l'épithélium intestinal.

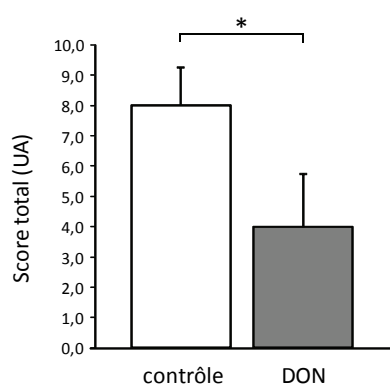
1 a



contrôle

DON

1 b



**Figure 1 – a** Effets de l'exposition au DON (4h, 10  $\mu$ M) sur la morphologie et les lésions de l'épithélium intestinal des explants **-b** Score morphologique et lésionnel total obtenu (\*  $P < 0,05$ ).

## 2.2. Effets du DON sur la réponse inflammatoire intestinale

L'intestin est impliqué à part entière dans les mécanismes de défense et les cellules épithéliales intestinales sont capables de produire diverses cytokines pro-inflammatoires ou des chémokines qui jouent un rôle dans l'activation et le recrutement des cellules immunitaires de la *lamina propria*.

La surexpression des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires IL-8 et IL-1 $\alpha$  est progressive et dépend du temps (Tableau 1).

Le niveau d'expression le plus élevé est atteint après 12 h. Au contraire, le niveau d'expression plus élevé de TNF $\alpha$  reste stable au cours des 12 h d'exposition au DON (Cano *et al.*, 2013).

Le niveau d'expression des chémokines CCL20 et CCR6, impliquées dans le recrutement des cellules dendritiques au site d'infection, est augmenté de manière importante (7 à 12 fois respectivement) par rapport à celui des explants contrôle. Le niveau d'expression de CX3CL1, impliqué dans l'inhibition de la différenciation des lymphocytes des populations Th1 et Th17, est maximal après 4h d'exposition au DON (22 fois par rapport au contrôle) puis diminue après 8h et 12h d'exposition.

Lorsqu'on compare ces données d'expression avec celles obtenues *in vivo* lors de l'exposition de porcs durant 5 semaines à un aliment contaminé par du DON (2,8 mg/kg d'aliment), on confirme l'augmentation du niveau d'expression des gènes IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-12 (Bracarense *et al.*, 2012).

**Tableau 1** – Etude de l'expression des gènes codant pour des médiateurs impliqués dans la différenciation de cellules Th17, le maintien des lymphocytes T régulateurs, le caractère pathogénique des lymphocytes Th17 et la réponse Th17 régulatrice dans des explants exposés de 4 à 12 h à 10  $\mu$ M de DON. Les cases blanches reflètent une modulation modérée du niveau d'expression des gènes ; les cases grises, une modulation importante. D'après Cano *et al.*, 2013.

	Gènes	Durée d'exposition		
		4 h	8 h	12 h
Cytokines pro inflammatoires	IL-8	↗↗	↗↗	↗↗
	TNF- $\alpha$	↗↗	↗	↗↗
	IL-1 $\alpha$	↗↗	↗	↗
Recrutement des cellules dendritiques	CCL20	↗	↗	↗
	CCR6	↗	→	→
	CX3CL1	↗↗	↗↗	→
	XCR1	↗	↗↗	↗
Réponse Th1	IFN- $\gamma$	→	→	→
	IL-12	↗↗	↗↗	↗↗
	T Bet	→	→	→
Réponse T régulatrice	RALDH	→	→	↘
	FoxP3	→	→	↘
Réponse Th17	IL-17A	↗↗	↗↗	↗↗
	IL-6	→	→	↗↗
	IL-1 $\beta$	↗↗	↗↗	↗↗
	STAT3	↗↗	→	↗
	ROR- $\gamma$ t	→	↘	→
Réponse Th17 pathogénique	IL-23A	↗↗	↗↗	↗↗
	IL-22	↗↗	↗	↗↗
	IL-21	↗	↗↗	↗
Réponse Th17 régulatrice	IL-10	↗	↗↗	↗↗
	TGF- $\beta$	→	→	→

Récemment, nous avons mis en évidence le fait que l'effet pro-inflammatoire du DON ne se limite pas au jéjunum, mais touche également des zones plus distales de l'intestin comme l'iléon, le caecum ou le côlon dans lesquelles le niveau d'expression des gènes IL-8 ou IL-1 $\beta$  est également augmenté (Tableau 2).

**Tableau 2** – Etude de l'expression des gènes codant pour l'IL-8 et l'IL-1 $\beta$  dans des explants issus de différents segments d'intestin et exposés à 10  $\mu$ M de DON. Le niveau d'expression a été normalisé par rapport à celui des explants contrôle arbitrairement fixé à 1 (\*  $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ).

	IL-8	IL-1 $\beta$
duodénum	4,1 $\pm$ 2,1	2,6 $\pm$ 1,2
jéjunum	3,8 $\pm$ 0,6 ***	8,2 $\pm$ 2,0 *
iléon	3,5 $\pm$ 0,9	3,6 $\pm$ 0,9
caecum	3,6 $\pm$ 0,7 **	6,1 $\pm$ 1,5*
côlon	7,1 $\pm$ 2,2 **	8,3 $\pm$ 2,2

L'utilisation d'explants pour évaluer la modulation de l'expression des gènes après une cinétique d'exposition au DON procure des données en cohérence avec celles obtenues lors d'expérimentations sur animaux.

Le DON entraîne une réponse inflammatoire précoce qui résulte de l'interaction entre différents types de cellules intestinales. Ces résultats montrent que le DON perturbe l'homéostasie intestinale et favorise une réponse de type Th17 pro-inflammatoire plutôt qu'une réponse de type Th1 à médiation cellulaire ou T régulatrice.

### 2.3. Etude sans a priori de l'effet du DON sur l'expression des transcrits du génome porcine

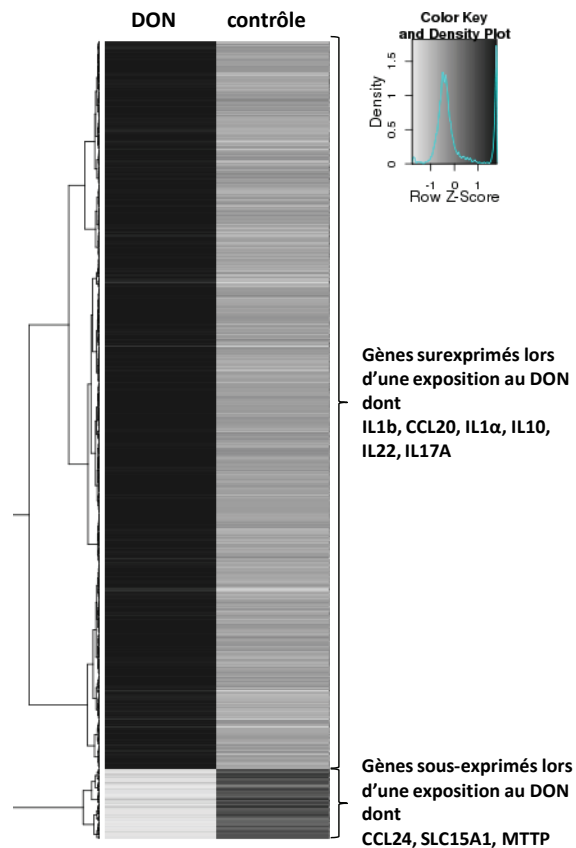
Les résultats précédents ont mis en évidence l'intérêt d'utiliser les explants pour évaluer l'effet des mycotoxines, à la fois au cours du temps et le long de l'axe proximo-distal. A la suite de cette étude focalisée sur les gènes de l'immunité, nous avons souhaité évaluer l'impact du DON sur l'expression des gènes de l'ensemble du génome (le transcriptome) porcine, en choisissant une approche de puce à ADN sans a priori. L'analyse des signaux d'hybridation sur la puce à ADN et le traitement des données ont permis de sélectionner 34775 spots après filtrage. L'analyse statistique a permis d'identifier parmi ces spots, 747 sondes différemment exprimées ( $p$ -value ajustée pour tests multiples par BH  $< 0,05$ ) entre les explants contrôles et ceux exposés au DON. Parmi ces sondes nous avons pu identifier 336 gènes annotés ayant une fonction biologique connue. La matrice 2D (Figure 2) représente la classification des sondes (lignes) et des conditions (colonnes). Les niveaux d'expression relative des gènes dans chaque condition sont représentés par différents niveaux de gris.

Les résultats obtenus ont révélé un profil d'expression des gènes très différent entre les explants contrôle et les explants exposés au DON. Le DON entraîne une surexpression de différentes cytokines (IL1 $\beta$ , CCL20, IL1 $\alpha$ , IL10, IL22, IL17A...) impliquées dans l'activation des lymphocytes T ou le recrutement des neutrophiles, et une sous-expression des gènes impliqués dans l'activation des lymphocytes T et le transport de molécules (CCL24, SLC15A1, MTTP).

Chaque gène porte un identifiant qui permet, grâce au logiciel Ingenuity Pathway Analysis, de réaliser des analyses de données multidimensionnelles pour mettre en évidence les principales fonctions biologiques ou pathologies dans lesquelles les gènes régulés sont impliqués ainsi que de possibles interactions entre les gènes co-régulés.

Cette analyse fonctionnelle a permis de montrer que ces gènes différemment exprimés étaient impliqués dans des fonctions de maintenance cellulaire, telles le fonctionnement des cellules immunitaires (lymphocytes, macrophages, cellules T) ainsi que la différenciation des cellules Th17, Th1 et Th2 de l'immunité.

En conclusion, cette méthode sans a priori nous a permis d'évaluer l'effet du DON sur la modulation de l'ensemble des gènes exprimés dans les explants de jéjunum de porc. Elle a permis de confirmer la capacité de cette mycotoxine à moduler la réponse immunitaire.



**Figure 2** – Effets du DON sur le transcriptome d'explants porcins après analyse sur puce à ADN.

La matrice 2D présente par différents niveaux de gris les profils d'expression des gènes différemment exprimés des explants exposés au DON par rapport aux explants contrôle ( $p$ -value ajustée  $< 0,05$ ).

### 2.4. Effets des fusariotoxines sur l'expression des MAPK

Le mode d'action le mieux connu par lequel le DON module la réponse immunitaire est lié à sa capacité à activer les voies de signalisation des MAPK qui à leur tour activent les gènes COX-2 and PGE-2, deux inducteurs majeurs de la réponse inflammatoire (Pestka *et al.*, 2004). Les MAPK, dont les plus connues sont ERK1/2, p38 et SAPK/JNK, sont des enzymes qui interviennent, par activation de cascades de signalisation, dans la transmission de signaux en réponse à des stimuli reçus par les cellules. L'enzyme ERK1/2 est impliquée dans la motilité cellulaire, la prolifération, la différenciation et la survie ; p38 joue un rôle dans le cycle cellulaire et la différenciation cellulaire alors que SAPK/JNK est impliquée dans la production de cytokines, la réponse inflammatoire ou l'apoptose (Avruch, 2007). Le modèle d'explants a été utilisé dans une situation d'exposition courte (1 h) pour comparer les effets de 2 concentrations de DON (5  $\mu$ M et 10  $\mu$ M) sur l'activation de ces protéines majeures impliquées dans les voies de signalisation.

Dans les explants exposés à 10  $\mu\text{M}$ , une augmentation significative de l'expression de la forme phosphorylée des MAPK ERK et p38 a été mise en évidence alors qu'aucun effet n'a été observé pour SAPK/JNK. Par ailleurs, aucune activation significative des MAPK n'a été observée après exposition à 5  $\mu\text{M}$  de DON (Tableau 3).

Ces résultats montrent que la modulation de l'activation des MAPK peut être appréciée grâce au modèle d'explants. Ils sont très cohérents avec les observations faites dans des échantillons de jéjunum de porcs exposés durant 35 jours à un aliment contaminé par du DON (2,3 mg/kg d'aliment) où l'on observe une augmentation de l'expression de la forme phosphorylée de ERK et p38 sans effet sur SAPK/JNK (Lucioli *et al.*, 2013). De plus, ces effets sur les MAPK, observés à la fois *in vivo* et *ex vivo*, sont en accord avec les données bibliographiques qui décrivent ce même type d'activation dans des modèles cellulaires dans des délais très courts après exposition au DON.

**Tableau 3** – Effet du DON sur l'activation des MAPK dans des explants exposés 1 h à 5  $\mu\text{M}$  ou 10  $\mu\text{M}$ , (\*  $P < 0,05$ ).  
D'après (Lucioli *et al.*, 2013)

	phospho ERK 1/2	phospho p38	phospho SAPK/JNK
contrôle	100 $\pm$ 39	100 $\pm$ 52	100 $\pm$ 30
DON 5 $\mu\text{M}$	104 $\pm$ 47	210 $\pm$ 146	131 $\pm$ 24
DON 10 $\mu\text{M}$	261 $\pm$ 76 *	576 $\pm$ 349 *	135 $\pm$ 40

## CONCLUSION

L'objectif de cette étude était de valider l'utilisation d'un modèle d'explants intestinaux permettant d'évaluer par des approches histologiques et moléculaires, les effets du DON sur l'intestin. Nous avons comparé les résultats obtenus sur les explants à ceux obtenus sur l'intestin de porcs exposés de façon sub-chronique à un aliment contaminé.

Des résultats comparables entre les expositions *ex vivo* et *in vivo* sont observés sur l'épithélium intestinal. Les coupes histologiques soulignent des modifications de la structure de l'épithélium et la présence de lésions similaires. Au niveau moléculaire, l'étude de l'expression des gènes montre notamment que ceux qui sont impliqués dans la réponse inflammatoire sont surexprimés à la fois *ex vivo* et *in vivo*.

L'évaluation de l'impact du DON sur le niveau d'activation des protéines des voies de signalisation des MAPK confirme *ex vivo* l'activation de ces médiateurs observée *in vivo* et *in vitro*.

S'il reste aujourd'hui à améliorer ce modèle de culture sur le plan de la conservation à long terme, il représente un très bon intermédiaire entre les modèles cellulaires et l'expérimentation animale. Il présente l'avantage d'un système d'étude *in vitro* avec des conditions d'exposition aux contaminants maîtrisées, tout en préservant l'architecture du tissu et les interactions entre les différents types cellulaires. Utilisé dans nos applications pour étudier les effets des mycotoxines sur l'intestin, il peut l'être également pour évaluer l'effet d'autres contaminants ou additifs alimentaires.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abouzi M.M., Azcona J.I., Braselton W.E., Pestka J.J., 1991. Immunochemical assessment of mycotoxins in 1989 grain foods: evidence for deoxynivalenol (vomitoxin) contamination. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 672-677.
- Avruch J., 2007. MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim. Biophys. Acta*, 1773, 1150-1160.
- Booth C., Potten C.S., 2000. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J. Clin. Invest.*, 105, 1493-1499.
- Bracarense A.P., Lucioli J., Grenier B., Drociunas Pacheco G., Moll W.D., Schatzmayr G., Oswald I.P., 2012. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. *Br. J. Nutr.*, 107, 1776-1786.
- Cano P.M., Seeboth J., Meurens F., Cognie J., Abrami R., Oswald I.P., Guzylack-Piriou L., 2013. Deoxynivalenol as a new factor in the persistence of intestinal inflammatory diseases: an emerging hypothesis through possible modulation of Th17-mediated response. *PLoS One*, 8, e53647.
- Gentleman R.C., Carey V.J., Bates D.M., Bolstad B., Dettling M., Dudoit S., Ellis B., Gautier L., Ge Y., Gentry J., Hornik K., Hothorn T., Huber W., Iacus S., Irizarry R., Leisch F., Li C., Maechler M., Rossini A.J., Sawitzki G., Smith C., Smyth G., Tierney L., Yang J.Y., Zhang J., 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*, 5, R80.
- Kolf-Clauw M., Castellote J., Joly B., Bourges-Abella N., Raymond-Letron I., Pinton P., Oswald I.P., 2009. Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: histopathological analysis. *Toxicol. In Vitro*, 23, 1580-1584.
- Lucioli J., Pinton P., Callu P., Laffitte J., Grosjean F., Kolf-Clauw M., Oswald I.P., Bracarense A.P., 2013. The food contaminant deoxynivalenol activates the mitogen activated protein kinases in the intestine: Interest of *ex vivo* models as an alternative to *in vivo* experiments. *Toxicol.*, 66, 31-36.
- Pestka J.J., Smolinski A.T., 2005. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.*, 8, 39-69.
- Pestka J.J., Zhou H.R., Moon Y., Chung Y.J., 2004. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicol. Lett.*, 153, 61-73.
- Pinton P., Oswald I.P., 2014. Effect of deoxynivalenol and other Type B trichothecenes on the intestine: a review. *Toxins (Basel)*, 6, 1615-1643.
- 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.
- Russel W.M.S., Burch R.L., 1959. The principles of human experimental technique. Methuen, London, UK, 54-66.
- Sergent T., Parys M., Garsou S., Pussemier L., Schneider Y.J., Larondelle Y., 2006. Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations. *Toxicol. Lett.*, 164, 167-176.
- Shimizu M., 2010. Interaction between food substances and the intestinal epithelium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 232-241.
- Streit E., Naehrer K., Rodrigues I., Schatzmayr G., 2013. Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *J. Sci. Food Agric.*, 93, 2892-2899.