

Effet cocktail des mycotoxines du groupe des trichothécènes B sur la santé intestinale du porc

Imourana ALASSANE-KPEMBI (1,2), Philippe PINTON (1), Olivier PUEL (1), Ting-Chao CHOU (3,4), Isabelle P. OSWALD (1)

(1) Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

(2) Hôpital d'Instruction des Armées, Camp Guézo 01BP517 Cotonou, Bénin

(3) Molecular Pharmacology & Chemistry Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY 10065, USA

(4) Adresse actuelle : PD Science LLC, Paramus, NJ 07652-1754 USA

imourana.lassane-kpemb@inra.fr

Effet cocktail des mycotoxines du groupe des trichothécènes B sur la santé intestinale du porc

Les trichothécènes B (TCT B) sont des mycotoxines produites par des champignons du genre *Fusarium*. Le déoxynivalénol (DON), le nivalénol (NIV), et leurs dérivés acétylés (3-acétyldéoxynivalénol : 3-ADON, 15-acétyldéoxynivalénol : 15-ADON et 4-acétylnivalénol ou fusarénone-X : FX) sont à l'origine de fréquentes co-contaminations des céréales. L'alimentation du porc, riche en céréales, et sa physiologie digestive font de lui une cible particulièrement sensible aux TCT B. Cependant, peu de données existent sur les effets combinés de ces mycotoxines, notamment au niveau intestinal. Sur des modèles in vitro de cellules épithéliales intestinales porcines et ex vivo d'explants de jéjunum porcins, la toxicité des mélanges de TCT B a été analysée en termes de synergie, additivité ou antagonisme. Les effets des mélanges des mycotoxines ont été évalués d'une part sur le renouvellement de l'épithélium intestinal et, d'autre part, sur l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-8, IL-17A et IL-22). Le type et l'amplitude des interactions ont été déterminés par la méthode des isobogrammes et indice de combinaison. Les associations des toxines deux à deux (DON et 3-ADON, DON et 15-ADON, DON et NIV, 15-ADON et 3-ADON) ont révélé des interactions de type synergique. Ces synergies, d'un facteur 3 à 10, observées aussi bien pour le renouvellement de l'épithélium intestinal que pour la réponse inflammatoire, apparaissent déjà aux faibles doses. Un antagonisme a été montré pour l'association DON et FX sur la prolifération cellulaire. Actuellement, la gestion du risque liée aux multi-contaminations mycotoxiques évolue vers l'utilisation de facteurs d'équivalence qui supposent une interaction de type additif et ne prennent donc pas en compte les possibles synergies. Les interactions de type synergique doivent être confirmées in vivo et devraient être prises en compte par la réglementation.

Combined effects of type B trichothecene mycotoxins on pig intestinal health

Type B trichothecene mycotoxins (TCT B) are secondary metabolites produced by *Fusarium fungi*. Deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV) and their acetylated derivatives (3-acetyldeoxynivalenol: 3-ADON, 15-acetyldeoxynivalenol: 15-ADON, and 4-acetylnivalenol or fusarenon-X: FX) frequently co-occur in cereals following fungal infection by *Fusarium* species in the field, or as part of postharvest spoilage. The cereal-based diet of pig, and its digestive physiology make it a particularly sensitive target to TCT B. Only few data exist regarding the combined intestinal toxicity of TCT B, especially at the intestinal level. Using in vitro porcine intestinal epithelial cells and the ex vivo pig jejunal explant model, the combined toxicity of TCT B was analysed in terms of synergy, additivity or antagonism. The combined effects of mycotoxins were measured on epithelial cell renewal and upregulation of the expression of cytokine genes (*IL-1 β* , *IL-8*, *IL-17A* and *IL-22*). The type and magnitude of interaction were analysed using the Combination Index-Isobologram method. The binary associations DON/3-ADON, DON/15-ADON, DON/NIV, and 3-ADON/15-ADON showed synergy starting from low doses, with the dose-reduction index ranging from 3-10 for both endpoints. An antagonistic effect was observed for the DON/FX association on epithelial cell renewal. Regulations are currently moving towards application of toxic equivalency factors for the combined toxicity of several groups of mycotoxins, but they do not consider possible synergy. The synergistic interactions reported here need to be confirmed in vivo and deserve further consideration for possible implementation in regulations.

INTRODUCTION

Le porc est particulièrement exposé aux mycotoxines, du fait de son alimentation qui est essentiellement composée de céréales. Contrairement aux polygastriques, doués de bonnes capacités de détoxification d'un certain nombre de mycotoxines, le porc est une espèce particulièrement sensible. Les trichothécènes B (TCT B) dont les plus importants sont le déoxynivalénol (DON), et ses dérivés acétylés 3-acétyldeoxynivalénol (3-ADON) et 15-acétyldeoxynivalénol (15-ADON), et le nivalénol (NIV) et son dérivé acétylé la fusarénone X (FX; 4-acétylnivalénol) constituent un groupe de mycotoxines produites par les moisissures du genre *Fusarium*. En raison de la forte prévalence de la fusariose du blé, les TCT B constituent les contaminants alimentaires les plus fréquents des céréales en zones tempérées. Les plans de surveillance à l'échelle de l'Union Européenne ont montré que le DON, le 15-ADON, le NIV, la FX et le 3-ADON étaient, respectivement, présents dans 57%, 20%, 16%, 10% et 8% des échantillons collectés (SCOOP 2003). Par ailleurs, plusieurs études soulignent la présence simultanée de ces mycotoxines dans les céréales (Eckard *et al.*, 2011; Schollenberger *et al.*, 2012). La plupart des études de toxicité ayant analysé les effets des mycotoxines individuellement, peu d'éléments existent à ce jour pour une évaluation du risque qui prenne en compte de possibles effets toxiques additifs, synergiques, voire antagonistes des TCT B.

Dans le tractus gastro-intestinal, la biodisponibilité des TCT B, comme celles d'autres contaminants alimentaires, est maximale, et l'intestin représente la première ligne de défense de l'organisme contre ces toxiques, mais également leur première cible. L'objectif de ce travail était donc d'étudier les effets individuels ainsi que les interactions des mycotoxines en termes d'additivité de synergie ou d'antagonisme sur la santé intestinale du porc en utilisant comme marqueurs le renouvellement de l'épithélium intestinal et l'homéostasie de la réponse inflammatoire.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Toxines

Les toxines DON, 15-ADON, 3-ADON (Sigma, St Quentin Fallavier, France), NIV et FX (Waco Pure Chemical Industries LTD, Osaka, Japon) ont été dissoutes dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) comme précédemment décrit (Alassane-Kpembé *et al.*, 2015) et conservées à -20 °C.

1.2. Culture et prolifération cellulaire

La lignée cellulaire IPEC-1 est dérivée de l'intestin grêle d'un mini-porc New Hampshire nouveau-né (Gonzalez-Vallina *et al.*, 1996). Les cellules ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂ saturée en humidité. Le milieu de culture complet est du DMEM/F12 (Eurobio, les Ulis, France) complété avec 5% de sérum de veau fœtal, 2 mM de L-glutamine, un cocktail d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine ; Eurobio), 15 mM d'Hépès (Eurobio), d'"epidermal growth factor" (5 µg/L ; Becton Dickinson Labware, Le Pont de Claix, France) et d'un mélange d'insuline, de transferrine et de sélénium (Sigma).

L'effet des toxines sur la viabilité des cellules en prolifération a été étudié par un test colorimétrique CellTiter 96® Non-

Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Charbonnière, France). Les cellules ont étéensemencées à la concentration de 104 cellules/puits dans 100 µL de milieu complet en plaques 96-puits (Costar, Cambridge, MA, USA). Après 24 heures, des concentrations croissantes de TCT B comprises entre 0,12 µM et 150 µM, isolément ou en mélange, ont été mises en contact avec les cellules. Les mélanges ont été réalisés à des niveaux de toxicité similaires déterminés lors d'expériences préliminaires (Alassane-Kpembé *et al.*, 2015). Les ratios étaient de 1:1 pour DON et 15-ADON ; 1:10 pour DON et 3-ADON ; 1:1 pour DON et NIV ; 1:0,8 pour DON et FX ; 1:0,8 pour NIV et FX. Après 48 heures d'incubation, 15 µL d'une solution préparée extemporanément de MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide) ont été ajoutés dans les puits. Une nouvelle étape de 4 heures d'incubation a été réalisée. La quantité de formazan soluble produite par réduction cellulaire du MTT a ensuite été déterminée par mesure de l'absorbance moyenne à 570 nm sur un lecteur de plaques ELISA (Infinite M200, TECAN, Autriche).

Le pourcentage de viabilité cellulaire a été établi en utilisant les valeurs corrigées d'absorbance (A) selon la formule:

$$\text{Viabilité (\%)} = \frac{A \text{ des puits traités à la (aux)mycotoxine (s)}}{A \text{ des puits traités au véhicule}} \times 100$$

1.3. Culture d'explants intestinaux de porc

L'activité pro-inflammatoire intestinale du DON et du NIV a été étudiée sur des explants intestinaux de six porcelets exposés *ex vivo* aux toxines. Les explants ont été préparés comme précédemment décrit (Alassane-Kpembé *et al.*, 2017). Brièvement, après incision longitudinale des fragments de jéjunum, 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 multi-puits et exposés pendant quatre heures à 39°C en atmosphère humide, à 5% de CO₂. Des concentrations croissantes de DON ou de NIV (entre 0 et 40 µM) seules ou en mélanges équimolaires ont été utilisées. En fin d'expérimentation, les explants ont été congelés dans l'azote liquide pour l'étude de l'expression des gènes.

1.4. Analyse de l'expression des gènes par PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Les explants de jéjunum ont été placés dans des tubes Lysing Matrix D (MP Biomedicals, Illkirch, France) contenant du phénol et du thiocyanate de guanidine (Extract-All, Eurobio, les Ulis, France). L'ARN a été extrait après la lyse du tissu dans un FastPrep FP120 (MP Biomedicals). La concentration, l'intégrité et la qualité de chaque ARN ont été déterminées par spectrophotométrie (absorbance à 260 nm) en utilisant un Nanodrop ND1000 (Labtech International, Paris, France). Les ARN totaux ont été rétro-transcrits en ADN complémentaires en utilisant le kit ADNc-RT High Capacity (Life Technologies, Saint Aubin, France). Les expériences de PCR quantitative en temps réel ont été réalisées dans des plaques de 384 puits dans un thermocycleur ViiA7 (Life Technologies) comme précédemment décrit (Cano *et al.*, 2013). Les séquences des amorces utilisées ont été publiées dans des travaux précédents (Alassane-Kpembé *et al.*, 2015; Cano *et al.*, 2013). Les gènes de la bêta-2-microglobuline (B2M) et de la protéine ribosomale L32 (RPL32) ont été utilisés comme gènes de référence pour la normalisation des données et le programme informatique REST© 2009 software (Qiagen, Valencia, CA, USA) a servi à l'analyse des données (Pfaffl *et al.*, 2002).

1.5. Analyse des données

Les relations dose-effet individuelles des mycotoxines ont été établies en ajustant les données brutes à l'équation de l'Effet Médian de la Loi d'action de masse (Chou, 2006) :

$$f_a/f_u = (D/D_m)^m$$

D étant la dose de mycotoxine, f_a la fraction d'effet produite par la dose D , et $f_u = 1 - f_a$. D_m est la dose produisant l'effet médian (correspondant à EC_{50}), et m est le coefficient de sigmoïdité de la courbe dose-effet ($m = 1$, $m > 1$, et $m < 1$ indiquent respectivement une courbe hyperbolique, sigmoïdale, ou sigmoïdale aplatie).

L'analyse des interactions a été faite en utilisant la méthode des isobogrammes et de l'index de combinaison (CI) dérivés de l'équation de l'Effet Médian de la Loi d'action de masse (Chou, 2006). Un isobogramme présente, pour deux composés en association, les différentes combinaisons de doses qui produisent la même amplitude d'effet. $CI = 0,9-1$, $CI < 0,9$, et $CI > 1,1$ indiquent, respectivement, un effet additif, une synergie, ou un antagonisme, indépendamment des mécanismes d'action de ces composés.

Pour les cas avérés de synergie, les index de réduction de dose (DRI) ont été calculés (Chou, 2006). Ces index indiquent pour un effet cible, le facteur de réduction à appliquer à la concentration du composé dans le mélange par rapport à une application individuelle.

L'analyse des relations dose-effet individuelles des mycotoxines ou de leurs mélanges pour la prolifération des cellules épithéliales intestinales et pour l'activité pro-inflammatoire intestinale, la détermination des valeurs des index de combinaison et des intervalles de confiance à 95% associés et la détermination des valeurs des index de réduction de dose et le tracé des graphes d'évolution des index de combinaison en fonction des fractions affectées (f_a -CI plots) ont été réalisés en utilisant le logiciel CompuSyn version 3.0.1 (ComboSyn Inc., Paramus, NJ, USA; Chou et Martin, 2005).

2. RESULTATS

Afin d'établir un différentiel de toxicité intestinale des TCT B et d'analyser leurs effets combinés, les effets individuels et les interactions de ces mycotoxines ont été étudiés d'une part sur la viabilité de cellules épithéliales intestinales en croissance et, d'autre part, sur l'activation de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoire dans la muqueuse intestinale.

2.1. Cytotoxicité et activité pro-inflammatoire des mycotoxines sur l'épithélium intestinal porcine

Après 24 heures d'exposition au DON, au NIV ou à leurs dérivés acétylés (3-ADON, 15-ADON, FX) une inhibition dose-dépendante de la viabilité de cellules épithéliales intestinales porcines a été observée (Figure 1). Le tableau 1 présente les concentrations de mycotoxines inhibant 10%, 50% et 75% de la viabilité des cellules épithéliales porcines en croissance. Sur la base de la concentration inhibant 50% de viabilité nous pouvons donc classer les mycotoxines comme suit :

3-ADON << DON < 15-ADON < FX < NIV.

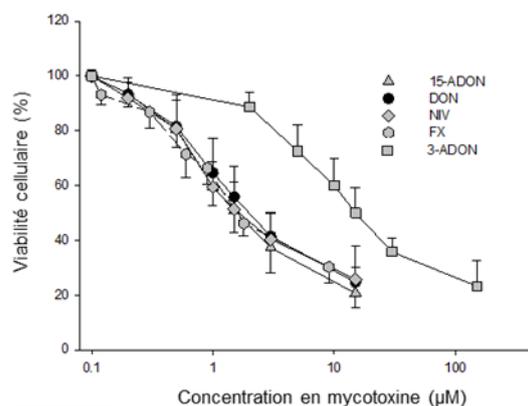


Figure 1 - Cytotoxicité comparée des mycotoxines sur cellules épithéliales intestinales porcines en croissance

Tableau 1 – Effets du DON, du NIV, et leurs dérivés acétylés sur la viabilité des cellules épithéliales intestinales en croissance

Mycotoxine	Doses cytotoxiques		
	EC_{50} (µM)	EC_{10} (µM)	EC_{75} (µM)
DON	3,56	0,31	12,03
3-ADON	19,84	1,06	85,71
15-ADON	2,41	0,24	7,72
NIV	2,11	0,17	7,43
FX	2,29	0,23	7,15

EC_{50} , EC_{10} et EC_{75} représentent les concentrations de mycotoxines inhibant de moitié, 10% et 75% la viabilité cellulaire. Ces valeurs ont été obtenues à partir de trois séries de cultures de cellules.

Afin d'évaluer les activités pro-inflammatoires exercées par le DON et le NIV sur la muqueuse intestinale, nous avons mesuré l'expression des cytokines IL-1 β , IL-8, IL-17A et IL-22 dans des explants de tissu jéjunal de porc. Une activation dose-dépendante de l'expression d'IL-8 (Figure 2 Panel A) et des trois autres cytokines a été observée. Cette activation de l'expression des cytokines atteint un plateau pour des concentrations entre 5 et 10 µM, et diminue ensuite pour les concentrations plus élevées (jusqu'à 40 µM).

Le tableau 2 présente les doses de DON, de NIV ou de leur mélange qui produisent la moitié de l'activation maximale de l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Sur la base de ces valeurs, l'activation de l'expression d'IL-8 a été la plus sensible à l'effet des mycotoxines testées.

Tableau 2 - Effet du DON, du NIV et de leur mélange sur l'activation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires

Cytokine	DON	NIV	DON+NIV (1:1)
	EC_{50}	EC_{50}	EC_{50}
IL-1 β	6,73	13,61	3,55
IL-8	2,73	12,32	2,76
IL-17	7,58	17,46	6,08
IL-22	4,67	19,75	4,79

EC_{50} est la concentration de toxine produisant la moitié de l'activation maximale pour un gène. Ces valeurs ont été obtenues à partir d'explants de jéjunum prélevés sur 6 porcelets.

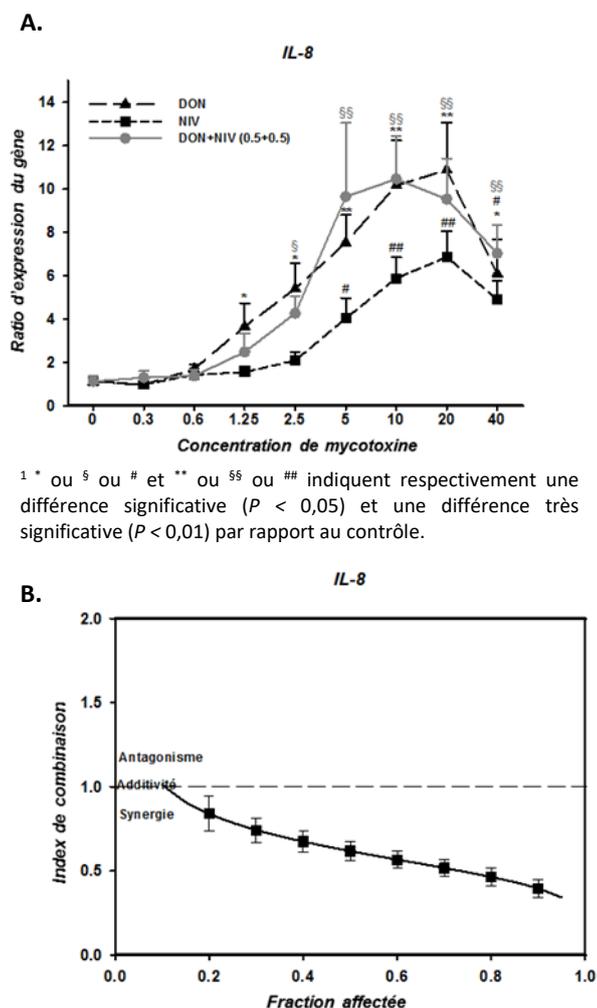


Figure 2 – Activités pro-inflammatoires individuelle et combinée du déoxynivalénol (DON) et du nivalénol (NIV)

A. Activations dose-dépendantes de l'expression du gène de l'IL-8 par le DON, le NIV et leur mélange¹.

B. Fa-CI plot indiquant une activation synergique de l'expression du gène de l'IL-8 par l'association DON-NIV.

2.2. Toxicité synergique des TCT B sur la prolifération cellulaire

Les interactions entre ces mycotoxines ont été ensuite analysées en termes d'additivité, d'antagonisme ou de synergie sur la viabilité des cellules épithéliales intestinales en croissance, et sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Les données de toxicité combinée ont été analysées par la méthode des isobogrammes et des index de combinaison.

La figure 3 présente les courbes dose-réponse de cytotoxicités individuelle et combinée et l'isobogramme pour 10%, 30% et 50% d'inhibition de la viabilité des cellules épithéliales intestinales porcines par le DON et son dérivé acétylé le 15-ADON. Sur ce type de graphe, les effets individuels de chacune des substances sont indiqués sur l'axe des abscisses et des ordonnées. Les effets combinés sont tracés sur le diagramme d'isoboles ; un effet additif suit la ligne diagonale entre les concentrations effectives de chaque toxine, les effets antagonistes ou synergiques des toxines se situent,

respectivement, au-dessus ou en dessous de cette ligne diagonale. Pour l'association DON et 15-ADON, nous observons que les points expérimentaux correspondant aux mélanges sont positionnés en-dessous des droites d'additivité pour 10%, 30% et 50% de cytotoxicité, indiquant clairement une interaction de type synergique. Il convient de noter que cette synergie apparaît dès les faibles doses.

Les interactions ont été également analysées en calculant les index de combinaison (IC) (Tableau 3). Les index observés étaient inférieurs à 0,9, indiquant une synergie des associations binaires de mycotoxines (DON/15-ADON, 15-ADON/3-ADON, et DON/NIV), avec des réductions de dose (DRI) d'un facteur de 2 à 7 entre 10% et 75% de cytotoxicité. Ces index de réduction de dose sont les facteurs de réduction devant être appliqués aux mycotoxines dans les associations synergiques pour des effets cibles maintenus à niveau constant.

Seul le mélange DON et FX a montré une interaction de type antagoniste.

Tableau 3 - Valeurs d'index de combinaison pour la cytotoxicité intestinale des associations binaires de TCT B

Mélange binaire	Index de combinaison à la cytotoxicité de		
	10%	30%	50%
DON/15-ADON	0,53	0,61	0,67
DON/3-ADON	1,67	1,18	0,96
15-ADON/3-ADON	0,49	0,56	0,61
DON/NIV	0,77	0,78	0,79
DON/FX	1,15	1,31	1,43
NIV/FX	0,91	0,91	0,91

2.3. Toxicité synergique du DON et du NIV sur l'expression des gènes de l'inflammation

En ce qui concerne l'activité pro-inflammatoire combinée du DON et du NIV, les index de combinaison ont également été calculés. L'évolution des index de combinaison en fonction des fractions d'activation de l'expression d'IL-8 est présentée dans la figure 2 Panel B. À l'image des autres cytokines, cette figure montre que, pour des effets supérieurs ou égaux à 20% correspondant à des doses de 1 µM de DON ou 3 µM de NIV et plus, la réponse pro-inflammatoire à une exposition intestinale simultanée au DON et au NIV est synergique, avec des valeurs d'index de réduction de dose comprises entre 2 et 14.

3. DISCUSSION

La muqueuse intestinale représente la plus grande surface d'échange entre l'organisme et le milieu extérieur. A ce titre, elle peut être fortement exposée aux contaminants alimentaires comme les mycotoxines. La présence simultanée du DON, du NIV et de leurs dérivés acétylés dans les denrées alimentaires est attestée dans nombre de publications (Eckard *et al.*, 2011; Schollenberger *et al.*, 2012). Les TCT en général partagent les mêmes modes d'action (Larsen *et al.*, 2004). Nous avons voulu proposer une échelle de toxicité intestinale relative pour le DON, le NIV et leurs dérivés acétylés vis-à-vis du renouvellement de l'épithélium intestinal, et établir la nature des interactions en termes de synergie, d'antagonisme ou d'additivité pouvant résulter d'une co-exposition alimentaire.

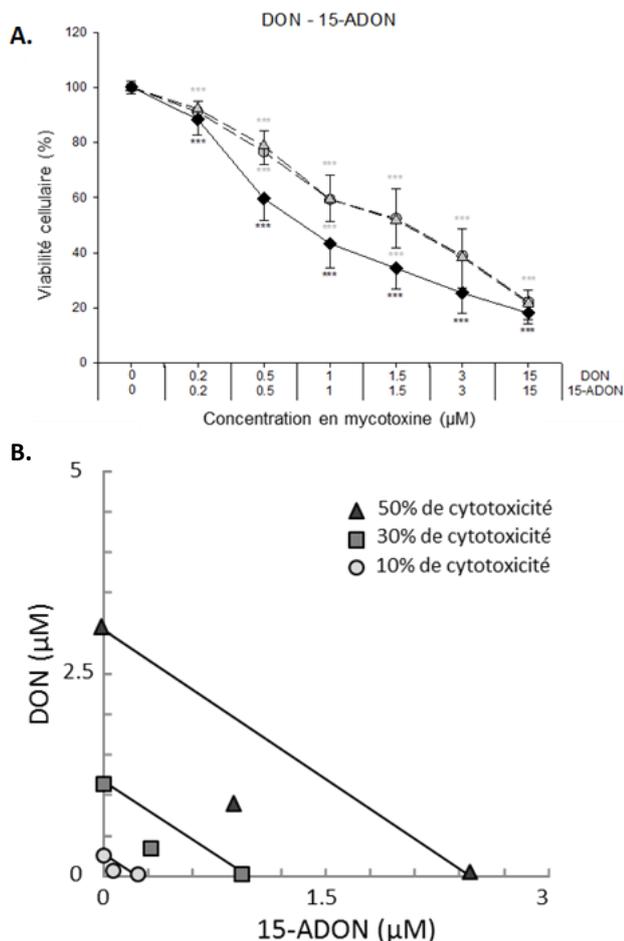


Figure 3 – Cytotoxicité combinée du déoxynivalenol (DON) et du 15-acétyldéoxynivalenol (15-ADON) sur des cellules épithéliales intestinales en croissance

A. Courbes dose-réponse du DON, du 15-ADON et de l'association DON-15-ADON (ratio 1:1).

B. Isobogrammes à 10%, 30% et 50% de cytotoxicité indiquant une synergie pour l'association DON-15-ADON

Les mycotoxines testées exercent une activité cytotoxique qui peut perturber l'homéostasie du renouvellement de l'épithélium intestinal. Cette activité a été démontrée en utilisant différents modèles *in vitro* d'épithélium intestinal (Bianco *et al.*, 2012; Pinton *et al.*, 2012). Nous avons évalué la cytotoxicité intestinale individuelle et combinée des TCT B en utilisant le modèle cellulaire d'épithélium intestinal. La lignée IPEC-1 est une lignée entérocytaire non transformée qui a gardé ses caractéristiques originelles d'épithélium intestinal, ce qui permet une meilleure extrapolation *in vitro* et *in vivo* des résultats (De Vos *et al.*, 2012).

Pour analyser l'activité pro-inflammatoire individuelle et combinée des mycotoxines sur la muqueuse intestinale, nous avons utilisé des explants jéjunaux (Alassane-Kpembé *et al.*, 2017). Pour une étude d'immunotoxicité, ce modèle présente l'avantage de conserver l'architecture tissulaire nécessaire à la mise en œuvre du dialogue entre les différentes lignées cellulaires intervenant dans la réponse immune. Il a déjà été utilisé pour une analyse transcriptomique de l'activité pro-inflammatoire intestinale du DON ou de la FX, avec des résultats corroborés par des dosages protéiques (Alassane-Kpembé *et al.*, 2017; Cano *et al.*, 2013).

Nous avons pu montrer qu'à des doses de l'ordre du micromolaire, les mycotoxines testées affectent de façon

significative l'homéostasie du renouvellement de l'épithélium intestinal porcine. Ces doses correspondent à des niveaux de contamination fréquemment rencontrés (Sergent *et al.*, 2006). L'exposition de l'intestin du porc aux TCT B a entraîné une activation dose-dépendante de l'expression d'IL-1 β , IL-8, IL-17A, et IL-22. L'exposition orale de la souris au DON s'accompagne d'une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans la rate, le foie, le rein et les poumons (Kinser *et al.*, 2004; Pestka et Amuzie, 2008).

Nous avons observé une activation bi-phasique de l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Une régulation non-monotonique de la production d'IL-8 par des cellules intestinales humaines exposées au DON a déjà été rapportée, avec un effondrement de la sécrétion de cette cytokine pour des concentrations de mycotoxine supérieures à 25 μ M (Maresca *et al.*, 2008). Une induction dose-dépendante de la production de plusieurs protéines SOCS (Suppressors of cytokine signalling) a également été mise en évidence dans le muscle et la rate de souris exposées oralement à des doses croissantes de DON (Pestka et Amuzie, 2008). Les SOCS jouent un rôle clé dans les voies de signalisation cellulaire impliquant des cytokines (Starr *et al.*, 1997). Ces protéines inhibent par un système de rétrocontrôles négatifs la signalisation des cytokines inflammatoires pour juguler les altérations tissulaires qui pourraient résulter d'une activation importante et durable des voies de l'inflammation.

Nous avons mis en évidence une toxicité intestinale synergique pour des associations entre le DON et ses dérivés acétylés, et pour l'association entre le DON et le NIV. Par contre, l'association entre le DON et la FX était antagoniste. L'implication de transporteurs membranaires dans les mécanismes de toxicité des TCT B pourrait déterminer la nature des interactions résultant de leurs actions simultanées. En effet, les TCT sont des molécules amphipatiques qui présentent des caractéristiques structurales communes aux substrats du transporteur d'efflux P-glycoprotéine (Pg-P) (Schinkel et Jonker, 2003). L'implication de la Pg-P, mais également d'un autre transporteur d'efflux, la Multidrug Resistance-associated Protein 2 (MRP-2) dans les mécanismes de passage transmembranaire et d'accumulation intracellulaire des TCT B a été démontrée (Tep *et al.*, 2007). En cas de présence intracellulaire simultanée de deux mycotoxines, une compétition pour les sites actifs des transporteurs se traduirait par un efflux moins performant pour la molécule de moindre affinité. L'accumulation de la molécule ayant la toxicité intrinsèque la plus forte se traduirait alors par une interaction de type synergique du mélange, et l'accumulation de la molécule ayant la toxicité intrinsèque la plus faible par une interaction de type antagoniste.

CONCLUSION

Nous avons montré dans cette étude que les TCT B exercent une toxicité intestinale individuelle et combinée à des concentrations de l'ordre du micromolaire. A ces doses courantes en alimentation, notre analyse des interactions toxicologiques a révélé que ces mycotoxines pourraient inhiber de façon synergique le renouvellement de l'épithélium intestinal, et entraîner une réponse pro-inflammatoire, avec des amplitudes de synergie d'un facteur 3 à 10. Toutefois, ces interactions doivent encore être confirmées *in vivo*, et leurs mécanismes élucidés pour leur prise en compte par la réglementation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alassane-Kpembé I., Gerez J.R., Cossalter A.M., Neves M., Laffitte J., Naylies C., Lippi Y., Kolf-Clauw M., Bracarense A.P.L., Pinton P., Oswald I.P., 2017. Intestinal toxicity of the type B trichothecene mycotoxin fusarenon-X: whole transcriptome profiling reveals new signaling pathways. *Sci. Rep.*, 7, 7530.
- Alassane-Kpembé I., Puel O., Oswald I.P., 2015. Toxicological interactions between the mycotoxins deoxynivalenol, nivalenol and their acetylated derivatives in intestinal epithelial cells. *Arch. Toxicol.*, 89, 1337-1346.
- Amuzie C.J., Shinozuka J., Pestka J.J., 2009. Induction of suppressors of cytokine signaling by the trichothecene deoxynivalenol in the mouse. *Toxicol. Sci.*, 111, 277-287.
- Bianco G., Fontanella B., Severino L., Quaroni A., Autore G., Marzocco S., 2012. Nivalenol and deoxynivalenol affect rat intestinal epithelial cells: a concentration related study. *PLoS One*, 7, e52051.
- Brondello J.M., Pouyssegur J., McKenzie F.R., 1999. Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44(MAPK)-dependent phosphorylation. *Science*, 286, 2514-2517.
- Cano P.M., Seebboth 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.
- Chou T.C., 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.*, 58, 621-681.
- Chou T.C., Martin N., 2005. CompuSyn for drug combinations: PC software and user's guide: a computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC50 and ED50 and LD50 values. *ComboSyn Inc Paramus* (ed).
- De Vos M., Huygelen V., Casteleyn C., Van Cruchten S., Van Ginneken C., 2012. Alternative models to study the intestinal barrier function of piglets. *Altern. Lab. Anim.*, 40, 26-27.
- Eckard S., Wettstein F.E., Forrer H.R., Vogelgsang, S., 2011. Incidence of Fusarium species and mycotoxins in silage maize. *Toxins* 3, 949-67.
- Gonzalez-Vallina R., Wang H., Zhan R., Berschneider H.M., Lee R.M., Davidson N.O., Black D.D., 1996. Lipoprotein and apolipoprotein secretion by a newborn piglet intestinal cell line (IPEC-1). *Am. J. Physiol.*, 271, G249-259.
- Kinser S, Jia Q, Li M, Laughter A., Cornwell P., Corton J.C., Pestka J., 2004. Gene expression profiling in spleens of deoxynivalenol-exposed mice: immediate early genes as primary targets. *J. Toxicol. Environ. Health A.*, 67, 1423-1441.
- Larsen J.C., Hunt J., Perrin I., Ruckebauer P., 2004. Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report. *Toxicol. Lett.*, 153, 1-22.
- Pestka J.J., Amuzie C.J., 2008. Tissue distribution and proinflammatory cytokine gene expression following acute oral exposure to deoxynivalenol: comparison of weanling and adult mice. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 2826-2831.
- Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.*, 30, e36.
- Pinton P., Tsybulskyy D., Lucioi J., Laffitte J., Callu P., Lyazhri F., Grosjean F., Bracarense A.P., Kolf-Clauw M., Oswald I.P., 2012. Toxicity of deoxynivalenol and its acetylated derivatives on the intestine: differential effects on morphology, barrier function, tight junction proteins, and mitogen-activated protein kinases. *Toxicol. Sci.*, 130, 180-190.
- Schinkel A.H., Jonker J.W., 2003. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55, 3-29.
- Schollenberger M., Müller H.M., Ernst K., Sondermann S., Liebscher M., Schlecker C., Wischer G., Drochner W., Hartung K., Piepho H.P., 2012. Occurrence and distribution of 13 trichothecene toxins in naturally contaminated maize plants in Germany. *Toxins*, 4, 778-787.
- SCOOP 2003. 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>
- Sergeant 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.
- Starr R., Willson T.A., Viney E.M., Murray L.J.L., Rayner J.R., Jenkins B.J., Gonda T.J., Alexander W.S., Metcalf D., Nicola N.A., Hilton D.J., 1997. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, 387, 917-921.
- Tep J., Videmann B., Mazallon M., Balleydier S., Cavret S., Lecoœur S., 2007. Transepithelial transport of fusariotoxin nivalenol: mediation of secretion by ABC transporters. *Toxicol. Lett.*, 170, 248-258.