



Une approche métabolomique pour comprendre les effets du déoxynivalénol et de la zéaralénone sur le microbiome intestinal du porc

Johan S. SAENZ (1,2), Alina KURZ (1,2), Ursula RUCZIZKA (3), Moritz BÜNGER (3), Maximiliane DIPPEL (3), Bertrand GRENIER (4), Veronika NAGL (4), Laure ROUXEL (5), Andrea LADINIG (3), Jana SEIFERT (1,2), Evelyne SELBERHERR (6)

(1) Institute of Animal Science, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany

(2) HoLMiR - Hohenheim Center for Livestock Microbiome Research, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany

(3) University Clinic for Swine, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria

(4) DSM - BIOMIN Research Center, Tulln, Austria

(5) DSM Nutritional Products, France

(6) Institute of Food Safety, Food Technology & Vet Public Health, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria

laure.rouxel@dsm.com

A metaproteomic approach to understand effects of deoxynivalenol and zearalenone on the porcine gut microbiome

As secondary metabolites of fungi, mycotoxins occur frequently before and after harvest in several agricultural commodities. According to the 2021 DSM World Mycotoxin Survey, deoxynivalenol (DON) is the most prevalent mycotoxin in Europe (detected in 53% of samples analysed), followed by zearalenone (ZEN) (detected in 45% of samples). The objective of this study was to evaluate the alteration of microbial composition and function in the small intestine of female weaned piglets after ingestion of different doses of these mycotoxins. Fifty female weaned piglets were allocated to five experimental groups: control – no contamination, DON-high – 2.5 mg/kg of feed, DON-low – 0.9 mg/kg of feed, ZEN-high – 1.6 mg/kg of feed, and ZEN-low – 0.7 mg/kg of feed). After 28 days, fifteen animals were euthanized, and the digesta and mucosal content of the jejunum and ileum were subjected to metaproteomic analysis. The gut metaproteome composition in the high-toxin groups shifted compared to that in the control and low mycotoxin groups, and it was also more similar among high-toxin groups. DON-high and ZEN-high increased the relative abundance of Actinobacteria and decreased the abundance of Firmicutes. Bacterial protein profiles were more similar between DON-high and ZEN-high. DON and ZEN reduced the abundance of key enzymes of upper glycolysis and increased proteins of the pentose phosphate pathway. In summary, ingestion of DON and ZEN altered the abundance of proteins associated with microbial metabolism and the oxidative-stress response, which disrupted the structure of the gut microbiome.

INTRODUCTION

La contamination des cultures par les mycotoxines est suivie depuis plusieurs années. Les métabolites secondaires des champignons, différentes mycotoxines sont ainsi fréquemment détectées dans les matières premières d'origine agricole. Le déoxynivalénol (DON) est la mycotoxine la plus répandue en Europe, détectée dans 53 % des échantillons analysés, suivie par la zéaralénone (ZEN), détectée dans 45 % des échantillons analysés (DSM World Mycotoxin Survey, 2021).

Ces mycotoxines, via les aliments, peuvent avoir des effets délétères sur la santé et représentent un risque sanitaire grave pour les hommes et pour les animaux d'élevage. Même si différents effets aigus et chroniques ont été décrits, l'impact des mycotoxines sur le métabolisme intestinal est peu connu.

L'étude présentée ici a été mise en place pour évaluer l'effet des mycotoxines DON et ZEN sur le microbiome intestinal de porcelets sevrés, en utilisant la métabolomique.

1. MATERIEL & METHODES

1.1. Dispositif expérimental

50 porcelets femelles (âgés de 35 jours) ont été inclus dans l'essai, après une phase d'acclimatation de 7 jours. Ils ont été répartis en cinq groupes (Témoin + 4 traitements). Tous les animaux ont été nourris *ad libitum* et ont eu un accès libre à l'eau pendant les 28 jours de l'essai.

Le groupe témoin a reçu le régime de base sans mycotoxines (analysé par HPLC-MS/MS). Pour les 4 traitements, la contamination artificielle du régime de base (par du matériel de culture de différentes souches de *Fusarium graminearum*) a été confirmée par analyse des aliments par HPLC-MS/MS : Niveaux de contamination par la ZEN de 0, 0,679 et 1,623 mg/kg d'aliment pour les groupes témoin, ZEN-bas et ZEN-haut, respectivement - Niveaux de contamination par le DON de 0,061, 0,87 et 2,493 mg/kg d'aliment pour les groupes témoin, DON-bas et DON-haut, respectivement. La contamination naturelle par d'autres mycotoxines majeures est marginale ou absente.

1.2. Mesures

Pour l'étude métabolomique, 3 porcelets par groupe ont été choisis au hasard, euthanasiés et 60 échantillons ont été collectés (15 porcelets, quatre matrices : jéjunum, iléon, digesta et échantillons de muqueuse). L'identification et la quantification des peptides/groupes de protéines, ainsi que leur affectation taxonomique et leur annotation fonctionnelle, ont été réalisées via MetaLab v.2.1.0 (Cheng *et al.*, 2017).

1.3. Analyse des résultats

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (v.4.0.2) et avec LFQ-Analyst.

2. RESULTATS & DISCUSSION

2.1. Effet des mycotoxines sur la composition protéique microbienne globale

Au total, 17 202 séquences peptidiques correspondant à 2094 groupes de protéines ont été identifiées dans l'ensemble des échantillons. Parmi les groupes de protéines identifiés, 76 % correspondent au microbiome intestinal et 24 % à l'hôte. Un plus grand nombre de ces groupes de protéines a été identifié dans les échantillons de digesta par rapport à ceux de la muqueuse. Et dans ces échantillons de digesta, la composition globale en protéines microbiennes a été affectée dans les groupes DON-haut et ZEN-haut.

Globalement, les lots DON-haut et ZEN-haut présentent des compositions protéiques proches, alors que celles des lots DON-bas et ZEN-bas sont proches de celles du groupe témoin. L'indice de dissimilarité de Bray-Curtis, permettant d'évaluer la dissimilarité entre deux échantillons donnés, en termes d'abondance sur un paramètre, a été calculé pour chaque traitement par rapport au groupe témoin, pour les familles de peptides identifiés. Ces indices sont significativement supérieurs pour les lots DON-haut et ZEN-haut (plus de dissimilarité), indiquant un impact significatif sur le microbiome (test de Wilcoxon par paire, correction de BH, $p < 0,05$). Aucun effet de ce type n'a été constaté pour les groupes DON-bas et ZEN-bas.

2.2. Effet des mycotoxines sur la composition microbienne

L'effet des mycotoxines sur la composition du microbiome a été examiné sur la base du calcul de l'abondance relative des peptides, associé aux différents taxons.

En général, les Firmicutes (59,8 % - 75,1 %) sont le phylum le plus abondant dans les échantillons, suivis par les Actinobactéries (0,1 % - 14,9 %) et les Protéobactéries (0,05 % - 0,4 %). La composition relative du microbiome des lots DON-haut et ZEN-haut est modifiée par rapport au groupe témoin,

avec diminution de l'abondance relative des Firmicutes, et augmentation des Actinobactéries. L'abondance relative des Firmicutes est diminuée de 20 % et de 10 % respectivement dans les groupes DON-haut et ZEN-haut par rapport au groupe témoin, tandis que l'abondance relative des Actinobactéries est multipliée par 12,5 et 6,9, respectivement. Aucun effet, ou seulement un effet faible, a été observé sur la composition microbienne des groupes DON-bas et ZEN-bas.

Le rapport calculé Actinobactéries / Firmicutes pour tous les échantillons a montré que l'exposition élevée à DON et ZEN a eu un effet significatif sur la dominance des Firmicutes par rapport aux Actinobactéries (ratio significativement supérieur, $P < 0,005$).

2.3. Effet des mycotoxines sur les fonctionnalités du microbiome intestinal

Les groupes de protéines différents en termes d'abondance ont été comparés et regroupés à l'aide de LFQ-Analyst. Les profils protéiques du microbiome intestinal sont les plus similaires entre les lots DON-haut et ZEN-haut.

Par exemple, et plus spécifiquement, l'exposition aux concentrations élevées en DON et ZEN a diminué l'abondance des protéines agissant en tant qu'enzymes clés dans le métabolisme des glucides (premières étapes de la glycolyse) mais ont augmenté celles impliquées dans la voie des Pentoses-Phosphates. Cette voie est considérée comme la première ligne de défense lors d'un stress oxydatif (Dubreuil *et al.*, 2020). La réduction de l'abondance des protéines impliquées dans la glycolyse et l'augmentation de l'abondance des agents antioxydants chez les animaux des lots DON-haut et ZEN-haut pourraient indiquer une adaptation du microbiome au stress oxydatif lié à l'exposition aux mycotoxines.

CONCLUSION

L'approche métabolomique montre que l'exposition à de fortes doses de DON et ZEN a un impact sur la composition microbienne intestinale et modifie l'abondance de différentes protéines associées au métabolisme microbien, déclenchant une perturbation de la structure du microbiome intestinal.

La présente étude renforce ainsi l'idée que l'altération du microbiome intestinal due à l'ingestion de mycotoxines peut être associée à une augmentation du stress oxydatif. La réduction de l'abondance des enzymes sensibles au stress oxydatif et l'augmentation des protéines capables d'y faire face en sont le signe.

Cette étude a été publiée dans : *Toxins*, 2021, 21, 13(8), 583.
doi: 10.3390/toxins13080583

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- DSM World Mycotoxin Survey, 2021. Disponible via : <https://www.dsm.com/anh/news/downloads/whitepapers-and-reports/2021-dsm-world-mycotoxin-survey-report.html>, consulté le 29/09/2022.
- Cheng K., Ning Z., Zhang X., Li L., Liao B., Mayne J., Stinzi A., Figey D., 2017. MetaLab: An automated pipeline for metaproteomic data analysis. *Microbiome*, 5, 157.
- Dubreuil M., Morgens D., Okumoto K., Honsho M., Contrepolis K., Lee-McMullen B., McAllister Traber G., Sood R., Dixon S., Snyder M., Fujiki F., Bassik M., 2020. Systematic identification of regulators of oxidative stress reveals non-canonical roles for peroxisomal import and the pentose phosphate pathway. *Cell Rep.*, 30, 1417–1433.