



# **Efficacité d'une fraction de levure enrichie en $\beta$ -glucanes sur la réduction des effets toxiques induits par le déoxynivalenol *in vitro* et *ex vivo***

Virginie MARQUIS (1), Julie SCHULTHESS (1), Isabelle P. OSWALD (2), Delphine PAYROS (2)

(1) Phileo by Lesaffre, 137 Rue Gabriel Péri, 59700 Marcq en Baroeul, France

(2) Toxalim (Research Center in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, Toulouse, France

[v.marquis@phileo.lesaffre.com](mailto:v.marquis@phileo.lesaffre.com)

## **Efficacité d'une fraction de levure enrichie en $\beta$ -glucanes sur la réduction des effets toxiques induits par le déoxynivalenol *in vitro* et *ex vivo***

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité d'une fraction de levure enrichie en  $\beta$ -glucanes pour réduire les effets toxiques du déoxynivalenol (DON) chez l'animal. Parmi les mycotoxines, le DON est l'une des plus fréquemment retrouvée dans l'alimentation animale, voire la plus répandue dans le monde. Les aliments contaminés en DON peuvent être responsables de plusieurs effets indésirables avec un impact majeur sur la santé et la production animale. Une fois ingéré par l'animal, le DON interagit initialement avec l'épithélium intestinal menant à des dommages intestinaux et à une altération de la fonction immunitaire. Les porcs sont les animaux les plus sensibles au DON. Ainsi, l'étude a été menée *in vitro* sur des cellules intestinales porcines IPEC-J2 et *ex vivo* sur des explants de jéjunum de porc. Sur les cellules IPEC-J2, la supplémentation en fraction de levure a permis de réduire les effets du DON sur la résistance électrique transépithéliale ainsi que le niveau d'expression de l'IL-8 fortement induit par le DON. Sur les explants de porc, l'étude histologique du tissu intestinal a montré une forte augmentation des lésions, quantifiées par le score histologique, en présence de DON. Ce score était réduit lors de la co-exposition avec le composé levuré. L'expression des gènes liés à l'inflammation (IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , TNFAIP3) a aussi été réduite en présence de la fraction de levure comparée au challenge DON seul. En conclusion, les résultats montrent, similairement *in vitro* et *ex vivo*, que la supplémentation en fraction de levure enrichies en  $\beta$ -glucanes permet de réduire l'inflammation induite par le DON et d'améliorer l'intégrité intestinale.

## **Efficacy of a yeast fraction enriched with $\beta$ -glucans in reducing toxic effects induced by deoxynivalenol *in vitro* and *ex vivo***

The objective of this study was to evaluate the effectiveness of a yeast fraction enriched in  $\beta$ -glucans in reducing toxic effects of deoxynivalenol (DON) in animals. Among mycotoxins, deoxynivalenol (DON), is one of the most prevalent and occurs worldwide in feed. DON-contaminated feed may be responsible for several adverse effects with a major impact on animal health and production. Once ingested by animals, DON initially interacts with the intestinal epithelium, leading to intestinal damage and impaired immune function. Pigs are the most sensitive animals to DON. Thus, the study was conducted *in vitro* on IPEC-J2 porcine intestinal cells and *ex vivo* on porcine jejunum explants. On IPEC-J2 cells, yeast-fraction supplementation reduced the effects of DON on transepithelial electrical resistance, and the level of IL-8 expression strongly induced by DON. On the porcine explants, histological analysis of the intestinal tissue showed a strong increase in the number of lesions, quantified by the histological score, in the presence of DON. This score was reduced during co-exposure with the yeast fraction. The expression of genes related to inflammation (IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , TNFAIP3) was also reduced in the presence of the yeast fraction compared to that of the DON challenge alone. In conclusion, the results show, similarly *in vitro* and *ex vivo*, that supplementation with a yeast fraction enriched in  $\beta$ -glucans can reduce DON-induced inflammation and improve intestinal integrity.

## INTRODUCTION

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques produits par diverses moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* ou *Fusarium* et pouvant contaminer l'alimentation destinée à l'homme ou aux animaux. La contamination des aliments pour animaux est fréquente et omniprésente. Plus de 70 % des matières premières et aliments pour animaux produits dans le monde sont contaminés par au moins une mycotoxine. Le déoxynivalénol (DON) est le plus fréquemment détecté, juste devant les fumonisines et la zéaralénone (Holanda *et al.*, 2021). Le DON appartient à la famille des trichothécènes. Il contamine généralement les céréales et les produits dérivés.

L'ingestion d'aliments pour animaux contenant du DON peut entraîner des vomissements, de l'anorexie, de la diarrhée ou même la mort lors d'intoxications aiguës (Pestka, 2007). Les porcs sont les animaux les plus sensibles aux mycotoxines. Même des concentrations extrêmement faibles de DON peuvent réduire la santé intestinale et altérer la fonction immunitaire (Antonissen *et al.*, 2014). Cette toxine induit des altérations histologiques, dont la nécrose de l'épithélium intestinal (Bracarense *et al.*, 2012). Le DON perturbe également la fonction de la barrière intestinale, ce qui peut entraîner une translocation accrue d'agents pathogènes et une plus grande sensibilité aux maladies infectieuses entériques. Le DON module aussi la réactivité immunitaire de la muqueuse intestinale, peut interagir dans le dialogue entre les cellules épithéliales et les cellules immunitaires intestinales et pourrait représenter un facteur prédisposant aux maladies inflammatoires.

Les mycotoxines sont résistantes aux transformations technologiques et, par conséquent, elles entrent facilement dans la chaîne alimentaire. Ces contaminants étant considérés comme inévitables, l'ajout de certains ingrédients ou additifs alimentaire permettant de limiter les effets de ces toxines, est une solution.

L'utilisation d'agents de détoxification des mycotoxines comme additifs alimentaires est avantageuse pour réduire les effets toxiques des mycotoxines chez les porcs et, en même temps, peut réduire le gaspillage des cultures et permettre une utilisation plus durable des aliments pour animaux. Il existe de nombreux mécanismes par lesquels les agents de détoxification des mycotoxines atténuent les effets toxiques des mycotoxines chez l'animal. L'un de ces mécanismes est l'adsorption, où la mycotoxine interagit avec une autre molécule (adsorbant) devenant non absorbable par le corps de l'animal. Sous forme adsorbée, la mycotoxine sera excrétée dans les matières fécales et ses effets toxiques seront minimisés chez l'animal. Un autre mécanisme consiste à utiliser ces agents pour stimuler la fonction immunitaire et la santé intestinale, rendant l'animal moins sensible aux effets toxiques des mycotoxines. Ces agents incluent fréquemment l'utilisation de prébiotiques, de probiotiques, de postbiotiques, de phytobiotiques et de symbiotiques.

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité d'une fraction de levure enrichie en  $\beta$ -glucanes pour réduire les effets toxiques du DON. Considérant que le DON, une fois ingéré par l'animal, interagit initialement avec l'épithélium intestinal menant à des dommages intestinaux, des modèles centrés sur l'intégrité de cet épithélium et la fonction immunitaire ont été utilisés. L'étude a été menée *in vitro* sur des cellules intestinales porcines IPEC-J2 et *ex vivo* sur des explants de jéjunum de porc.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Etude *in vitro* des effets du DON sur le jéjunum du porc

#### 1.1.1. Culture cellulaire et produits

La lignée cellulaire d'entérocytes porcins intestinaux (IPEC-J2) est une lignée permanente non transformée. Ces cellules ont été initialement isolées de l'épithélium jéjunal d'un porcelet nouveau-né non allaité en 1989 à l'université de Caroline du Nord (Berschneider, 1989). La lignée a été obtenue auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC, France).

Les cellules ont été cultivées dans du milieu de culture DMEM/F12 complétement avec 5 % de sérum de veau fœtal, 16 mM d'Hépès, du facteur de croissance épidermique (5  $\mu$ g/L) et de l'ITS (mélange d'insuline, transférine et sélénium ; Sigma, St Quentin Fallavier, France). Les cellules ont été maintenues dans une atmosphère saturée en eau, à 5 % de CO<sub>2</sub>, à 37°C.

Le déoxynivalénol (Libios, Pontcharra sur Turdine) a été dissout à 30 mM dans de l'acétonitrile et stocké à -20°C. Pour les cultures cellulaires, le DON a été dilué à 3 mM dans de l'eau/acétonitrile (90/10, v/v).

Les fractions de levure enrichies en  $\beta$ -glucanes (Safglucan®, Phileo, Marcq-en-Baroeul, France) ont été reprises dans du milieu de culture à une concentration de 10 mg/L.

Quatre modalités d'incubation ont été réalisées, l'effet du DON a été comparé aux cellules contrôles non traitées et aux cellules co-exposées DON et fractions de levure, une incubation des cellules a été réalisée en présence des fractions de levure seules afin de vérifier l'impact de ces dernières.

#### 1.1.2. Mesure de la perméabilité membranaire

Les cellules épithéliales intestinales porcines ont étéensemencées dans du milieu complet sur des filtres Tranwells poreux (porosité de 0,4  $\mu$ m ; Becton-Dickinson Labware). Après s'être assuré de la confluence des cellules, les compartiments apicaux et basaux ont été remplis avec du milieu complet DMEM/F12. Les cellules ont été cultivées pendant 6 jours en présence ou non de fractions de levure puis pendant 24 h en présence de 10  $\mu$ M de DON et l'effet de la mycotoxine sur l'intégrité de la monocouche de cellules a été évalué. L'intégrité des jonctions serrées a ainsi été évaluée par la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) en utilisant un CellZscope (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France). Les valeurs expérimentales de résistance transépithéliale ont été exprimées en kohms x cm<sup>2</sup> / pourcentage du contrôle.

L'intégrité de la monocouche de cellules a été mise en évidence par microscopie à fluorescence.

#### 1.1.3. Analyse de l'expression des gènes par PCR quantitative

L'ARN a été extrait à l'aide du kit Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ 96 Kit ARN. L'ARN total a été extrait selon les recommandations du fabricant et la concentration a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre. Dix  $\mu$ L d'ARN total ont ensuite été utilisés pour effectuer la transcription inverse en ADN complémentaire grâce au kit Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription.

#### 1.1.4. Animaux

Les expérimentations ont eu lieu dans les installations de l'unité Toxalim (INRAE, Toulouse) avec l'accord du comité d'éthique (saisine n°TOXCOM/0163/PP). Elles ont été conduites sur des porcelets sevrés âgés de cinq semaines, pesant environ 10kg, élevés dans des conditions d'alimentation et environnementales qui représentent le plus possible celles

d'animaux d'élevage. Deux lots de six animaux ont été anesthésiés par électronarcose puis euthanasiés par exsanguination avant le prélèvement d'échantillons d'intestin.

### 1.1.5. Préparation des explants

Des segments de jéjunum ont été prélevés et rincés dans du milieu de culture Williams E froid (Sigma, St Quentin Fallavier, France) complété avec un mélange d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine et gentamicine). A l'aide de punches à biopsies, des explants (de 6 mm de diamètre pour les analyses en qPCR et de 8 mm de diamètre pour les analyses histologiques) ont été prélevés puis déposés sur des éponges placées dans des plaques multipuits. Les explants ont été incubés durant 4 h à 39°C et 5 % de CO<sub>2</sub> dans du milieu de Williams E complété par du glucose (25 g/L), 1 % ITS, 1 % Ala-Glu (3 mol/L), 1 % pénicilline/streptomycine et 0.5 % gentamicine. Le DON (Sigma), dilué dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), a été rajouté au milieu de culture. Dans la condition de contrôle, une concentration identique de DMSO a été rajoutée au milieu. Les explants ont été exposés ou non à une concentration de toxine de 10 µM, ceci en présence ou non de fraction de levure à 10 mg/L. En fin d'expérimentation, les explants ont été récoltés et conditionnés dans du fixateur pour des études histologiques, ou congelés à -80°C pour l'étude de l'expression des gènes.

### 1.1.6. Analyses histologiques

Des sections de 5 µm ont été réalisées à partir des blocs de paraffine contenant les explants de jéjunum. Elles ont ensuite été colorées à l'hématoxyline-éosine (H&E) pour une analyse histopathologique. Les changements histologiques ont été évalués et un score lésionnel a été établi sur la base du degré de sévérité et de l'étendue de différents critères décrits dans le tableau 1 et basés sur des études préalables (Terciolo et al., 2019). Le score de chaque lésion a été obtenu en multipliant le facteur de sévérité par l'étendue de la lésion. Le score pour l'organe a ensuite été obtenu par la somme de chaque score de lésion. Facteur de sévérité (ou degré de sévérité) : 1 = lésions légères, 2 = lésions modérées, 3 = lésions graves ; l'étendue de chaque lésion (intensité ou fréquence observée) a été évaluée et notée 0 = aucune lésion, 1 = faible étendue (>25%), 2 = étendue intermédiaire (>50%), 3 = grande étendue (>75%).

**Tableau 1** – Critères histologiques utilisés pour déterminer le score lésionnel histologique

Type de lésion	Facteur de sévérité
Vacuolisation des cellules	1
Débris	1
Morphologie des entérocytes	2
Perte des microvillosités	2
Atrophie des villosités	2
Fusion des villosités	2
Œdème dans la zone interstitielle	2
Nécrose apicale des villosités	3
Nombre des villosités	3
Score lésionnel maximal	54

Une mesure de la profondeur des cryptes et de la longueur des villosités a également été réalisée à l'aide du logiciel d'analyse d'image NIS-Elements-Ar (Nikon System-Elements-Advanced research).

### 1.1.7. Analyse de l'expression des gènes par PCR quantitative

L'ARN a été extrait comme décrit précédemment (Pierron et al., 2016). Brièvement, les explants jéjunaux ont été homogénéisés dans des tubes contenant des billes en céramique dans 1 mL d'ExtractAll en utilisant l'homogénéisateur de tissus Precellys Evolution. L'ARN total a été extrait selon les recommandations du fabricant et la concentration a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre. Deux µg d'ARN total ont été retrotranscrits en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide d'un kit de transcription inverse d'ADNc de grande capacité. Les amorces ont été conçues à l'aide de l'outil PrimerQuest et achetées chez Sigma. Les essais de PCR en temps réel ont été réalisés sur 10 ng d'ADNc (5 µl de volume de réaction par puits) dans des plaques à 384 puits en utilisant le mélange maître Power SYBR® Green PCR et l'appareil de PCR en temps réel Vii7 pour l'acquisition des données.

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel LinRegPCR (version 2016.0) et les valeurs NO (concentrations de départ) ont été normalisées en utilisant l'hydroxyméthylbilane synthase (HMBS), la B2M (β-2-microglobuline) et la Topoisomerase 2 b (TOP2) comme gènes de référence. Les données ont été présentées en fold change par rapport à la condition expérimentale contrôle. L'expression de vingt gènes a été étudiée, comprenant des gènes de ménage (TOP2, HMBS, β-2-microglobuline), des gènes liés à l'inflammation et à la production de cytokines (IL-1β, IL-8, IL-10, IL-17a, IL-22, CCL20, PTGS2, TNFAIP3, FOSL1, IL-1α, NOR1), des gènes de protéines des jonctions serrées (claudin 2, claudin 4 et E-Cadherin) ainsi que des gènes de défensines (DEF β1, DEF β2 et DEF β3).

## 1.2. Analyses statistiques

Les données expérimentales ont été présentées sous forme de moyennes ± SEM (erreur standard à la moyenne). Tous les tests ont été effectués avec GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA). Les analyses ont été réalisées sur des séries de valeurs appariées afin de tenir compte des différences entre les traitements pour un même individu.

Pour les analyses histologiques, les différences entre les différents groupes expérimentaux ont été évaluées à l'aide d'une analyse de variance à sens unique, suivie d'un test de Bonferroni. Une valeur  $P < 0,05$  a été considérée comme significative.

Pour les analyses de l'expression génique, un test de Student non paramétrique suivi d'un test de Wilcoxon sur série appariée a été utilisé pour différencier l'effet entre les différents traitements.

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

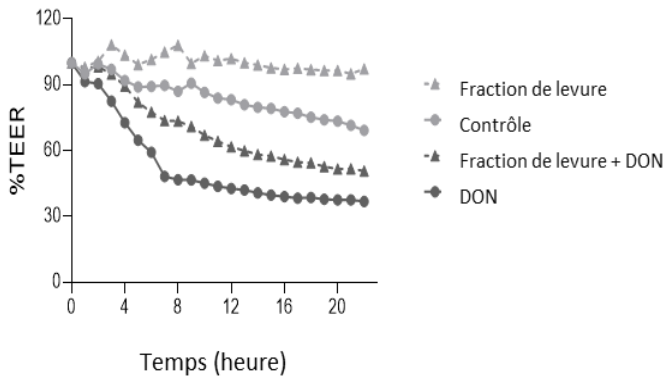
### 2.1. Effet du DON *in vitro* sur les cellules IPEC-J2 en présence ou non de fraction de levure enrichie en β-glucanes

#### 2.1.1. Intégrité de la barrière intestinale

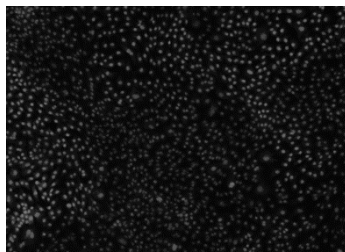
Comme le montre la figure 1, le DON a perturbé l'intégrité de la monocouche de cellules épithéliales intestinales, avec une baisse de la TEER de 50 % dès 7 h d'incubation. Cet effet a été proportionnel au temps d'interaction avec la toxine.

Les fractions de levure enrichies en β-glucanes ont permis de maintenir une résistance transépithéliale légèrement au-dessus des valeurs du contrôle cellulaire non traité. De plus, lorsque les cellules ont été préalablement traitées par les fractions de levure, l'intégrité de la couche cellulaire a été en partie

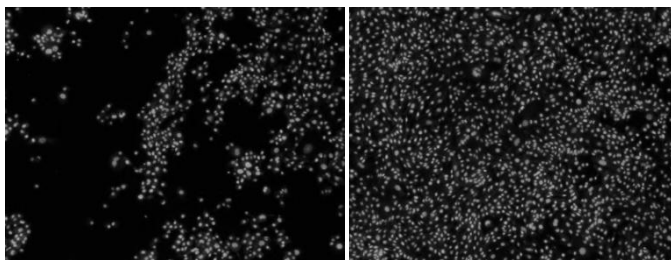
préservée lors de l'exposition au DON. Ces résultats sont illustrés sur la figure 2 montrant les images des tapis cellulaires en microscopie à fluorescence.



**Figure 1** – Effet du DON sur la résistance transépithéliale des cellules IPEC-J2 en présence ou non de fractions de levure. Mesure de la TEER sur 24 h après mise en contact avec le DON (10  $\mu$ M) (n=5)



IPEC-J2 + Contrôle



IPEC-J2 + DON

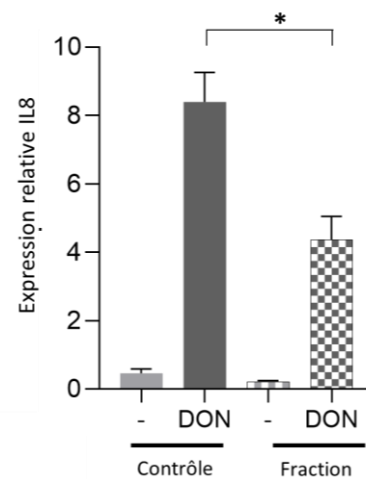
IPEC-J2/fraction de levure + DON

**Figure 2** – Effet du DON et des fractions de levure sur l'intégrité de la barrière intestinale capturée sous microscope à fluorescence. Les images ont été prises après 24h d'exposition à 10 $\mu$ M de DON.

Ces résultats montrent que lorsque les cellules sont exposées à de faibles doses de toxine, la fonction de barrière est altérée.

### 2.1.2. Activité pro-inflammatoire du DON sur les cellules épithéliales intestinales IPEC-J2

Les cytokines jouent un rôle prépondérant dans la réponse immune et inflammatoire consécutive à une exposition au DON. Ainsi leur équilibre est important pour la protection contre le DON. Afin d'évaluer l'activité pro-inflammatoire exercée par le DON sur les cellules intestinales, les niveaux d'expression des ARNm de l'IL-8 ont été mesurés. Les résultats sont présentés sur la figure 3.



**Figure 3** – Niveau d'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 chez des porcs exposés ou non au DON (10  $\mu$ M) et co-exposé ou non à une solution à base de fractions de levure (10 mg.L<sup>-1</sup>). (n=5) (\*  $P < 0,05$ )

Après 24 h d'exposition au DON, une augmentation significative de l'expression d'IL-8 est observée. En présence de la fraction de levure, l'augmentation de l'expression de l'IL8 est significativement moins forte.

Ces effets observés à la suite d'une exposition courte au DON étaient attendus et concordent avec les précédentes études sur les IPEC-J2 ainsi qu'avec les lésions nécrotiques du tractus gastro-intestinal rapportées dans des études de toxicité chronique ou aiguës (Pestka et Smolinski, 2005 ; Holanda and Kim, 2020).

## 2.2. Effet du DON *ex vivo* sur les explants de jejunum de porcelets en présence ou non de fraction de levure enrichie en $\beta$ -glucanes

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

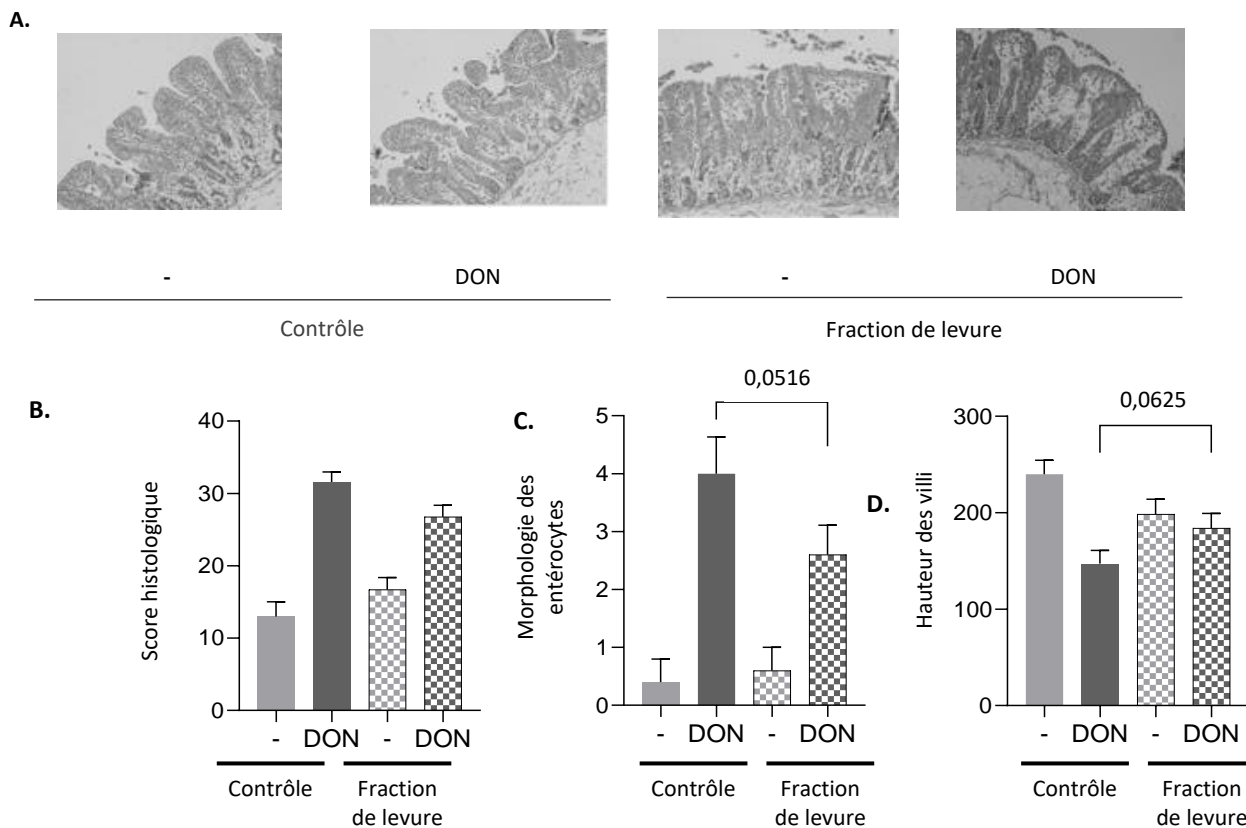
L'analyse histo-morphologique de coupes d'explants a permis d'évaluer l'impact du DON sur l'épithélium intestinal. Au niveau histologique, l'épithélium jéjunum des explants exposés au DON (10  $\mu$ M) présentait une forte augmentation (142 %) du score lésionnel (Figures 4A et 4B) par rapport à la condition contrôle. Ces atteintes ont été caractérisées par une forte altération des villosités (Figure 4A), la présence importante de débris cellulaires au niveau de la lumière intestinale (augmentation de plus de 150 % chez les explants exposés au DON), l'observation de cellules épithéliales cubiques (Figure 4C) accompagnée d'une perte des microvillosités et une vacuolisation des cellules dans les villosités. Ces observations se sont traduites par une augmentation importante du score lésionnel.

La solution à base de levures n'a pas eu d'effet statistiquement significatif sur le score lésionnel dans les explants de jejunum seuls ou co-exposés au DON (Figure 4B), une légère diminution du score lésionnel a toutefois été observée lors de la co-exposition.

Comme précédemment observé (Garcia *et al.*, 2018), une diminution significative ( $P < 0,05$ ) d'environ 35 % de la longueur des villosités a été observée dans les explants de jejunum traités avec du DON (10  $\mu$ M) pendant 4 h (Figure 4D).

Le traitement des explants exposés au DON avec la fraction de levure n'a pas modifié significativement la taille des villosités en comparaison au groupe contrôle, bien qu'une tendance ait été observée (augmentation de 14,38 % à la dose 10 mg.L<sup>-1</sup> par rapport à l'exposition seule au DON) (Figure 4D).

L'exposition au DON ou à une solution à base de levure n'a pas modifié significativement la profondeur des cryptes (données non présentées).



**Figure 4** – (A) Coupe de jéjunum montrant les lésions morphologiques chez les cochons exposés ou non au DON (10 μM) et co-exposé ou non à une solution à base de levure (10 mg.L<sup>-1</sup>) pendant 4 h. Grossissement x10 (n= 7 animaux). (B) Score lésionnel obtenu à partir de coupes de jéjunum avec une coloration à l'hématoxyline –éosine (données appariées, \* P < 0,05). (C)/(D) Représentation en histogramme de la morphologie des entérocytes (C) et de la longueur des villosités (D) dans le jéjunum de cochons exposés ou non au DON (10 μM) et co-exposés ou non à une solution de fraction de levure (10 mg.L<sup>-1</sup>) pendant 4 h (n= 7 animaux).

### 2.2.1. Effets du DON sur l'expression génique

Les résultats sont présentés dans le tableau 2. Comme attendu, l'exposition des explants avec 10 μM de DON pendant 4 h a conduit à une augmentation de la production des transcrits de gènes liés à l'inflammation. Ainsi, nous avons observé une augmentation significative de la production des transcrits pour les gènes suivants : IL-1β, IL-8, IL-17a, IL-1α, FOSL1, TNFAIP3, PTGS2 et IL-10.

On a noté une tendance à l'augmentation de la production des transcrits pour les gènes CCL20 et IL-22 en réponse à l'exposition des explants avec 10 μM de DON.

L'utilisation de la solution à base de fraction de levure seule n'a pas modifié l'expression des gènes et ce quelle que soit la dose utilisée.

On a noté que la solution à base de fractions de levure a significativement modulé à la baisse de manière dose dépendante l'expression des transcrits pour les gènes IL-1β et IL-8. Une tendance à la baisse a également été observée pour IL-1α, PTGS2, CCL20 et FOSL1.

Aucun effet de la solution à base de levure n'a été observé sur l'expression des gènes IL-10, IL-17, TNFAIP3 et IL-22 lorsque les explants ont été co-exposés avec 10μM de DON.

### 2.2.2. Discussion

Les résultats expérimentaux obtenus ont mis en évidence un effet délétère de l'exposition au DON sur la morphologie et l'intégrité du tissu jéjunal avec notamment une diminution de la taille des villosités ainsi qu'une augmentation du score lésionnel. Ces observations avaient déjà été rapportées dans des travaux précédents (Bracarense *et al.*, 2012 ; Garcia *et al.*, 2018). Comme déjà constaté, l'exposition au DON n'a pas influencé la profondeur des cryptes. La décomposition du score lésionnel nous a permis de rendre compte de l'action plus précise du DON sur le tissu jéjunal. De ce fait, les atteintes tissulaires liées à une exposition au DON des explants de jéjunum ont principalement été caractérisées par une atteinte au niveau des villosités, une augmentation des débris dans la lumière intestinale et une atteinte de la morphologie des entérocytes.

Comme précédemment décrit dans des travaux publiés, l'exposition d'explants de jéjunum à 10 μM de DON a exacerbé l'expression des gènes liés aux processus inflammatoires comme les gènes des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, IL-8, IL-17, IL-1α, de la protéine inflammatoire des macrophages MIP-3α (également connu sous le nom de CCL20) et la cyclooxygénase 2 (également connu sous le nom de PTGS2).

**Tableau 2** – Effet du DON et des fractions de levure sur l'expression de différents gènes dans les explants de porc.

Gène	DON 10 µM	Fraction de levure	Co-exposition DON + fraction de levure
Lié à l'inflammation			
IL-1β	↗ ***	pas d'effet	↘ *
IL-8	↗ ***	pas d'effet	↘ *
IL-10	↗ *	pas d'effet	↗ *
IL-17a	↗ *	pas d'effet	↗ *
IL-1α	↗ *	pas d'effet	↘ °
TNFAIP3	↗ **	pas d'effet	↘
FOSL1	↗ *	pas d'effet	↘
PTGS2	↗ *	pas d'effet	↘ °
CCL20	↗ °	pas d'effet	↘ °
IL22	↗ °°	pas d'effet	↘ °°
Défensines			
DEF β1	↗ *	pas d'effet	↘
DEF β2	↗ °°	pas d'effet	↘
Protéines de jonctions serrées			
Claudin 4	↗ °	pas d'effet	↘
Claudin 2	NS	pas d'effet	NS
E cadherin	NS	pas d'effet	NS

Légende : ↗ augmentation de l'expression par rapport au contrôle, ↘ la fraction de levure diminue les effets du DON sur l'expression (°°  $P < 0,15$ , °  $P < 0,10$ , \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ ).

Parmi les autres gènes les plus régulés, on a trouvé FOSL-1, qui régule la prolifération, la différenciation ou la transformation des cellules (Alassane-Kpembé et al., 2017; Pierron et al., 2016). Peu d'effet de l'exposition au DON a été observé sur l'expression des gènes des jonctions serrées.

L'action combinée de l'exposition au DON et à la solution de fraction de levure enrichie en β-glucanes n'a pas eu d'effet significatif sur les atteintes tissulaires induites par l'exposition au DON. En revanche, il est à noter que l'action de la solution de fraction de levure a eu tendance à diminuer les atteintes au niveau des villosités qui corrèlent avec une absence de diminution

de la taille des villosités dans les groupes expérimentaux co-exposés au DON et à la solution de fraction de levure. Cependant aucune action de la solution de fraction de levure n'a été rapportée sur la quantité de débris retrouvée dans la lumière. Au contraire, l'action « abrasive » (contact physique) de la solution de fraction de levure a pu masquer les effets potentiellement bénéfiques de ce produit destiné à l'alimentation des porcs sur ce paramètre.

Lorsque les explants intestinaux ont été traités avec la solution à base de levure et exposés au DON, le nombre de gènes exprimés de manière différente a diminué de moitié. L'expression génique des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-8 a été diminuée de manière dose-dépendante dans les explants exposés au DON et à la solution de levure. Une même tendance a été observée dans le cadre des gènes PTGS2 et CCL20. La solution à base de levure a cependant démontré une efficacité limitée sur l'expression d'autres gènes tels que l'IL-10 et l'IL-17a.

## CONCLUSION

Cette étude avait pour objectif d'évaluer les effets toxiques du DON sur l'intestin du porc et les potentiels bénéfiques d'une fraction de levure enrichie en β-glucanes dans la protection contre ces effets délétères, en utilisant des *approches in vitro* et *ex vivo*.

La solution à base de fractions de levure testée dans ces conditions expérimentales a modulé l'expression des gènes associés aux réponses inflammatoires en diminuant leur expression en comparaison aux explants et cellules seulement exposés au DON. Dans l'ensemble, les résultats ont montré que les fractions de levure enrichies en β-glucanes ont réduit l'inflammation dans le jéjunum induite par le DON. Cependant les difficultés d'interprétation des résultats concernant l'histologie nécessitent des analyses complémentaires pour confirmer les effets bénéfiques des fractions de levure sur l'action du DON, notamment par des essais *in vivo*.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alassane-Kpembé I., Puel O., Pinton P., Cossalter A.M., Chou T.C., Oswald I.P., 2017. Co-exposure to low doses of the food contaminants deoxynivalenol and nivalenol has a synergistic inflammatory effect on intestinal explants. *Arch Toxicol.* 91, 2677–87.
- Antonissen G., Martel A., Pasmans F., Ducatelle R., Verbrugghe E., Vandebroucke V., Li S., Haesebrouck F., Van Immerseel F., Croubels S., 2014. The impact of Fusarium mycotoxins on human and animal host susceptibility to infectious diseases. *Toxins*, 6, 430-452.
- Berschneider H.M. 1989. Development of normal cultured small intestinal epithelial cell lines which transport Na and Cl. *Gastroenterology* 96, A41.
- Bracarense A.P.F.L., Lucoli 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, 1776–86.
- García G.R., Payros D., Pinton P., Dogi C.A., Laffitte J., Neves M., Gonzalez Pereyra M., Cavaglieri L., Oswald I.P., 2018. Intestinal toxicity of deoxynivalenol is limited by *Lactobacillus rhamnosus* RC007 in pig jejunum explants. *Arch Toxicol.* 92, 983–93.
- Holanda D.M., Kim S.W., 2020. Efficacy of Mycotoxin Detoxifiers on Health and Growth of Newly-Weaned Pigs under Chronic Dietary Challenge of Deoxynivalenol. *Toxins*, 12, 311.
- Holanda D.M., Kim S.W., 2021. Mycotoxin Occurrence, Toxicity, and Detoxifying Agents in Pig Production with an Emphasis on Deoxynivalenol. *Toxins*, 13, 171.
- Pestka J.J., 2007. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Anim Feed Sci Tech*; 137,283–98.
- Pestka J.J., Smolinski A.T., 2005. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 8, 39-69.
- Pierron A., Mimoun S., Murate L.S., Loiseau N., Lippi Y., Bracarense A.P.F.L., Schatzmayr G., He J.W., Zhou T., Moll W.D., Oswald I.P., 2016. Microbial biotransformation of DON: molecular basis for reduced toxicity. *Sci Rep*, 6:29105.
- 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.
- Terciolo C., Bracarense A.P.F.L., Souto P.C.M.C., Cossalter A-M., Dopavogui L., Loiseau N., Oliveira C.A.F., Pinton P., Oswald I.P., 2019. Fumonisin at doses below EU regulatory limits induce histological alterations in piglets. *Toxins*, 11, 548.