



# THÈSE

*En vue de l'obtention du grade de :*

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

*Délivré par :*

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

*Discipline :*

Pathologie, Toxicologie, Nutrition

---

*Présentée et soutenue par :*

**Yann WACHÉ**

Le 29 avril 2009

*Titre :*

**TOXICOLOGIE DU DÉOXINIVALÉNOL CHEZ LE PORC : EFFETS SUR LA RÉPONSE IMMUNITAIRE, LA FLORE INTESTINALE ET LA SENSIBILITÉ AUX PATHOGÈNES**

---

*Jury :*

Dr Florence Mathieu	Professeur d'Université – ENSAT	Président
Dr Gwenaëlle Le Blay	Maitre de conférence – Université de Brest	Rapporteur
Dr Sylvaine Lecoeur	Chargé de recherche – INRA Lyon	Rapporteur
Dr Jean-Marc Fremy	Directeur de recherche – AFSSA DERNS	Examineur
Dr Gibert Postollec	Docteur Vétérinaire - AFSSA	Co-directeur de Thèse
Dr Isabelle Oswald	Directeur de recherche – INRA Toulouse	Directeur de Thèse

---

*École doctorale :*

SEVAB

*Unité de recherche :*

Laboratoire de Pharmacologie – Toxicologie – UR66 INRA TOULOUSE  
Unité Alimentation Animale – AFSSA PLOUFRAGAN

*Directeur de Thèse:*

Dr Isabelle Oswald



# THÈSE

*En vue de l'obtention du grade de :*

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

*Délivré par :*

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

*Discipline :*

Pathologie, Toxicologie, Nutrition

---

*Présentée et soutenue par :*

**Yann WACHÉ**

Le 29 avril 2009

*Titre :*

**TOXICOLOGIE DU DÉOXINIVALÉNOL CHEZ LE PORC : EFFETS SUR LA RÉPONSE IMMUNITAIRE, LA FLORE INTESTINALE ET LA SENSIBILITÉ AUX PATHOGÈNES**

---

*Jury :*

Dr Florence Mathieu	Professeur d'Université – ENSAT	Président
Dr Gwenaëlle Le Blay	Maitre de conférence – Université de Brest	Rapporteur
Dr Sylvaine Lecoeur	Chargé de recherche – INRA Lyon	Rapporteur
Dr Jean-Marc Fremy	Directeur de recherche – AFSSA DERNS	Examineur
Dr Gibert Postollec	Docteur Vétérinaire - AFSSA	Co-directeur de Thèse
Dr Isabelle Oswald	Directeur de recherche – INRA Toulouse	Directeur de Thèse

---

*École doctorale :*

SEVAB

*Unité de recherche :*

Laboratoire de Pharmacologie – Toxicologie – UR66 INRA TOULOUSE  
Unité Alimentation Animale – AFSSA PLOUFRAGAN

*Directeur de Thèse:*

Dr Isabelle Oswald

## REMERCIEMENTS

Les travaux de cette thèse ont été effectués dans le cadre d'une collaboration entre l'Institut National pour la Recherche Agronomique (INRA) et l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des aliments (AFSSA).

*Je tiens tout d'abord à remercier toutes les personnes qui m'ont permis de réaliser et de mener à son terme cette thèse :*

Le Dr Thierry Pineau, directeur de l'Unité UR66 INRA de Toulouse, pour leur accueil au sein de l'unité. Merci de m'avoir permis de réaliser mes travaux au sein du laboratoire.

Le Dr Salvat Gilles, directeur de centre AFSSA – Ploufragan, pour m'avoir accueilli au sein des locaux de l'AFSSA.

Le Dr Isabelle Oswald, directeur de cette thèse, pour son accueil au sein de l'équipe d'immuno-toxicologie de l'UR66 de l'INRA de Toulouse. Je te remercie de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail, et pour m'avoir guidé et supporté dans les moments difficiles. Merci pour ton encadrement, tes encouragements, ta disponibilité et surtout pour ta patience.

Le Dr Gilbert Postollec, co-encadrant de cette thèse, pour son aide précieuse au bon déroulement de mes travaux à l'AFSSA. Je te remercie pour toute l'aide et la disponibilité dont tu as fait preuve dans les bons et mauvais moments, tant pour les expérimentations que pour la rédaction.

Le Dr Burel Christine, à l'initiative de ce projet, pour son accueil dans l'unité alimentation Animale de l'AFSSA. Merci de m'avoir accordé ta confiance pour mener à bien tout ces travaux.

Le Dr Charlotte Valat pour ses conseils pertinents et son aide, ô combien importante dans la rédaction de ce mémoire.

Le Dr Philippe Fravallo pour son accueil dans l'unité Hygiène et Qualité des Produits Avicole et Porcins de l'AFSSA – Ploufragan. Je te remercie pour ton aide et tes conseils dans la réalisation de mes travaux, même résidant de l'autre côté de l'océan.

*Je remercie également toutes les personnes extérieures qui m'ont accueilli dans leur laboratoire et qui ont participé à l'ensemble de mes travaux de thèse :*

Les Dr Christine Roques et Laila Haddioui pour leur accueil au sein du laboratoire de microbiologie - Fonderephar de la Faculté des sciences pharmaceutiques de Toulouse. Merci à Haouaria Belkhelda pour son aide dans mes travaux.

Le Dr Eric Cox pour m'avoir accueilli dans le laboratoire d'immunologie de la Faculté de médecine vétérinaire de Gand. Merci au Dr Franck Verdonck et à Bert Devriendt, pour m'avoir enseigné quelques techniques indispensables pour la suite de mes travaux, et pour la découverte de la gastronomie belge.

Le Pr Yasuyuki Mori de l'Institut National de la santé animale à Tsukuba, Japon, pour son accueil au sein de son laboratoire. Merci pour les techniques de laboratoire et plus encore pour m'avoir fait découvrir un pays surprenant.

Je n'oublie pas toutes les équipes des unités dans lesquelles j'ai réalisé mes travaux à Ploufragan. Un grand merci pour votre disponibilité et vos conseils.

Je tiens également à adresser tous mes remerciements et mon affection à toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce projet, et pour leur soutien tout au long de ces trois années de thèse.

Merci Philippe, Anne-Marie, Eric, Maryline pour votre aide technique, votre encadrement et vos conseils précieux dans toutes les réalisations techniques, et toutes les personnes trop nombreuses pour être citées ici mais à qui je dois beaucoup.

Merci à ma famille, mes amis, et toutes les personnes qui ont partagé avec moi ces trois années de travail. Merci pour votre soutien et vos encouragements.

## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### Articles

**Waché Y.J.**, Valat C., Postollec G., Bougeard S., Burel C., Oswald I.P. and Fravallo P. **2009**. Impact of Deoxynivalenol on the intestinal microflora of pigs. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 1-17.

**Waché Y.J.**, Hbabi-Haddioui L., Guzylack-Piriou L., Belkhelfa H., Roques C. and Oswald I.P. The mycotoxin Deoxynivalenol inhibits the cell surface expression of activation markers in human macrophages. *Manuscrit Soumis au journal "Toxicology"*, avril 2009.

**Waché Y.J.**, Taranu I., Braicu C., Laffitte J., Saedikouzehkonani N., Pinton P., Mori Y. and Oswald I.P. Deoxynivalenol, DON, disrupts the immune function and IL-8 production in porcine neutrophils. *Manuscrit en préparation*.

### Article en collaboration

Devriendt B., Gallois M., Verdonck F., **Waché Y.**, Bimczok D., Oswald I.P., Goddeeris B.M. and Cox E. **2009**. The food contaminant fumonisin B<sub>1</sub> reduces the maturation of porcine CD11R1<sup>+</sup> intestinal antigen presenting cells and antigen-specific immune responses, leading to a prolonged intestinal ETEC infection. *Vet. Res.* **40**, 40.

### Reuves Scientifiques

Etienne, M. and **Waché, Y.** **2008**. Biological and physiological effects of deoxynivalenol (DON) in the pig. In *Mycotoxins in Farm Animals*, Oswald, I.P. and Taranu, I., Eds. Reseach Signpost: Kerala, pp 113-130.

### Communications affichées en congrès

**Waché Y.J.**, Haddioui L., Belkhelfa H., Mori Y., Riveron E., Roques C. and Oswald I.P. *In vitro* effects of Deoxynivalenol on human and porcine phagocytic cells. Poster – *XII international IUPAC Symposium on mycotoxins and phycotoxins*; Istanbul Turkey, 21-25 mai 2007.

**Waché Y.J.**, Valat C., Postollec G., Bougeard S., Queguiner M., Cariolet R., Burel C., Oswald I.P. and Fravallo P. Évaluation *in vivo* de l'impact du Déoxynivalénol (DON) sur la flore microbienne intestinale des porcs, lors de l'ingestion d'un aliment naturellement contaminé. Poster – *Congrès Gen2bio* ; La Baule France, 31 mars 2009.

# SOMMAIRE

# **TABLE DES MATIERES**

REMERCIEMENTS	1
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	3

## **SOMMAIRE**

TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	8
LISTE DES ABREVIATIONS	9

## **INTRODUCTION**

CONTEXTE DE L'ETUDE	11
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE : LE DEOXYNIVALENOL	13

### **1. Présentation générale**

1.1. Production	13
1.2. Distribution	13
1.3. Propriétés Physico-chimiques	14

### **2. Mycotoxicoles**

### **3. Toxicologie expérimentale**

3.1. Absorption, élimination et métabolisme	16
3.2. Toxicité générale	17
3.3. Carcinogénicité et génotoxicité	17
3.4. Reproduction	17
3.5. Flore intestinale	17
3.6. Immunotoxicité	18
3.6.1. <i>Effets paradoxaux du DON sur les fonctions immunitaires</i>	18
3.6.2. <i>Cas particulier des IgA</i>	19
3.6.3. <i>Mécanismes moléculaires</i>	19

### **4. Effets biologiques et physiologiques du DON chez le porc (Revue bibliographique)**

## **TRAVAIL EXPERIMENTAL**

OBJECTIF DE LA THESE	41
----------------------	----

### **CHAPITRE I : EFFETS DU DON SUR LES CELLULES PHAGOCYTAIRES DU SYSTEME IMMUNITAIRE NON SPECIFIQUE : ETUDE IN VIVO.**

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	45
----------------------------------	----

<b>1. Effets du DON sur l'expression des marqueurs de surface des macrophages humains (Article 1) :</b>	<b>47</b>
Introduction	
Matériels et méthodes	
Résultats	
Discussion	
<b>2. Effet du DON sur les fonctions des neutrophiles porcins stimulés par du LPS (Article 2)</b>	<b>66</b>
Introduction	
Matériels et méthodes	
Résultats	
Discussion	
<b>CHAPITRE II : EFFETS DU DON SUR LA FLORE INTESTINALE ET LE PORTAGE ASYMPTOMATIQUE DES SALMONELLES CHEZ LE PORC : ETUDE <i>IN VIVO</i>.</b>	<b>84</b>
<b>CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE</b>	<b>85</b>
<b>1. Impact du DON sur la flore intestinale des porcs (Article 3)</b>	<b>88</b>
Introduction	
Résultats	
Discussion	
Matériels et méthodes	
<b>2. Impact du DON sur le portage asymptomatique de salmonelles chez le porc</b>	<b>106</b>
Introduction	
Matériels et méthodes	
Résultats	
Discussion	
<b><u>DISCUSSION GENERALE</u></b>	<b><u>123</u></b>
<b>1. Rappels des objectifs</b>	<b>124</b>
1.1. Effet du DON sur les cellules phagocytaires	124
1.2. Effet du DON sur la flore intestinale et la sensibilité aux salmonelles des porcs	124
<b>2. Effets du DON sur les cellules de la réponse immunitaire non spécifique : étude <i>in vitro</i></b>	<b>125</b>
2.1. Protocole expérimental	125
2.1.1. <i>Le type cellulaire</i>	125
2.1.2. <i>Les agents de stimulation</i>	126
2.1.3. <i>Doses d'exposition</i>	126
2.2. Le DON diminue les capacités fonctionnelles des cellules phagocytaires	127
2.2.1. <i>Capacité à diminuer la migration des neutrophiles et l'adhésion des macrophages (expression de CD54)</i>	127
2.2.2. <i>Capacité à diminuer la signalisation et la coopération cellulaire de la réponse immunitaire non spécifique</i>	128



2.3. Conséquences de la présence de DON sur la réponse immunitaire non spécifique et la sensibilité aux infections	130
2.4. Perspectives	131
<b>3. Effet du DON sur la flore intestinale et le portage de <i>Salmonella Typhimurium</i> : étude <i>in vivo</i></b>	<b>132</b>
3.1. Protocole expérimental	132
3.1.1. Dose d'exposition au DON	132
3.1.2. Aliment	132
3.1.3. Echantillonnage	133
3.1.4. Modèle animal	133
3.1.5. Modèle infectieux	133
3.2. Effet du DON sur la flore intestinale et sur le portage de salmonelles	134
3.2.1. Cas d'une intoxication des animaux par le DON	134
3.2.2. Le DON peut altérer l'équilibre de la flore intestinale des porcs	135
3.2.3. L'ingestion d'une alimentation au DON n'aggrave pas l'excrétion de salmonelles	135
3.3. Perspectives	136
3.3.1. Approfondir les aspects descriptifs et fonctionnels des effets observés	136
3.3.2. Conditions « terrains »	137
<b>4. Perspectives: relation entre les essais <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i></b>	<b>138</b>
<b><u>CONCLUSIONS</u></b>	<b>140</b>
<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b>	<b>142</b>
<b><u>ANNEXES</u></b>	<b>154</b>

## LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

**Liste des figures et tableaux inclus dans les parties non traitées sous forme de revues ou d'articles scientifiques, soit l'introduction et la partie II-2. du travail expérimental.**

- Tableau 1. Caractéristiques et réglementations en vigueur pour les principales mycotoxines retrouvées dans les céréales
- Tableau 2. Nombre de porcs excréteurs de *Salmonella* Typhimurium sur l'ensemble des animaux infectés après exposition à un aliment contaminé ou non en DON
- Tableau 3. Nombre de porcs excréteurs de *Salmonella* Typhimurium sur l'ensemble des animaux infectés avant exposition à un aliment contaminé ou non en DON
- Figure 1. Structure chimique du déoxynivalenol
- Figure 2. Description des mécanismes moléculaires et des signaux de transduction impliqués dans la toxicité induite par le DON
- Figure 3. Protocole expérimental : distribution et traitements des porcs lors de l'étude expérimentale
- Figure 4. Evolution des paramètres de croissance des porcs infectés ou non par *Salmonella* Typhimurium après exposition à un aliment contaminé ou non en DON
- Figure 5. Dénombrement des coliformes thermotolérants fécaux des porcs infectés par *Salmonella* Typhimurium après exposition à un aliment contaminé ou non en DON
- Figure 6. Concentration sérique en IgA des porcs infectés ou non par *Salmonella* Typhimurium après exposition à un aliment témoin ou contaminé en DON
- Figure 7. Évolution de la séroconversion spécifique des porcs infectés par *Salmonella* Typhimurium après exposition à un aliment témoin ou contaminé en DON
- Figure 8. Evolution des paramètres de croissance des porcs infectés ou non par *Salmonella* Typhimurium avant exposition à un aliment témoin ou contaminé en DON
- Figure 9. Dénombrement des coliformes thermotolérants fécaux des porcs infectés par *Salmonella* Typhimurium avant exposition à un aliment témoin ou contaminé en DON
- Figure 10. Concentration sérique en IgA des porcs infectés ou non par *Salmonella* Typhimurium avant exposition à un aliment témoin ou contaminé en DON
- Figure 11. Évolution de la séroconversion spécifique des porcs infectés par *Salmonella* Typhimurium avant exposition à un aliment témoin ou contaminé en DON

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>ADN</b>	Acide déoxy-ribonucléique	<b>IL</b>	Interleukine
<b>AFSSA</b>	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments	<b>iNOS</b>	Nitric oxydase synthèse
<b>AMB</b>	Aerobic mesophilic bacteria	<b>INRA</b>	Institut National de la Recherche Agronomique
<b>ANOVA</b>	Analysis of variance	<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal Kinase
<b>AP-1</b>	Activator protein-1	<b>LDH</b>	Lactate deshydrogénase
<b>ASR</b>	Anaérobie sulfite-réductrice	<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>CAST</b>	Council for Agricultural and Sciences Technology	<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>CD</b>	Clusters of differentiation	<b>MDMs</b>	Monocyte-derived macrophages
<b>C/EBP</b>	CAAT Enhancer-Binding Protein	<b>MFI</b>	Mean fluorescence index
<b>CE-SSCP</b>	Capillary electrophoresis single-stranded conformation polymorphism	<b>MHC II</b>	Major histocompatibility complex class II
<b>CFU</b>	Colony forming unity	<b>MIP-2</b>	Macrophage inflammatory protein -2
<b>CIRC</b>	Comité International de Recherche sur le Cancer	<b>MPO</b>	Myeloperoxidase
<b>COX-2</b>	Cyclooxygénase 2	<b>mARN</b>	Acide ribonucléique messagers
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid	<b>NF- B</b>	Nuclear factor - B
<b>DO</b>	Densité optique	<b>NIV</b>	Nivalenol
<b>DON</b>	Deoxynivalenol	<b>OTA</b>	Ochratoxine A
<b>ELISA</b>	Enzyme linked immuno sorbent assay	<b>NO</b>	Nitric oxyde
<b>EOPS</b>	Exempt d'organismes pathogènes spécifiques	<b>PAGE</b>	Polyacrylamide gel electrophoresis
<b>EPT</b>	Eau peptonée tamponnée	<b>PCA</b>	Principal component analysis
<b>ERK</b>	Extracellular Signal Regulated Kinase	<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>FAM</b>	Flore aérobie mésophylle	<b>PI</b>	Post-inoculation
<b>FAO</b>	Food and Agricultural Organization	<b>PMN</b>	Polymorphonuclear neutrophil
<b>FCS</b>	Fetal calf serum	<b>ppb</b>	Partie par billion
<b>FITC</b>	Fluoresceine isothiocyanate	<b>ppm</b>	Partie par million
<b>GMQ</b>	Gain moyen quotidien	<b>PV</b>	Poids vifs
<b>HLA</b>	Human leukocyte antigen	<b>RFU</b>	Relative unit of fluorescence
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase	<b>RNA</b>	Ribonucleic acid
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer	<b>SCOOP</b>	Scientific Cooperation on questions relating to Food
<b>ICAM</b>	Intracellular adhesion molecule	<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate
<b>ICs</b>	Indice de séroconversion	<b>SEM</b>	Standard error of the mean
<b>IFN</b>	Interferon	<b>SVF</b>	Sérum de veau foetal
<b>Ig</b>	Immunoglobuline	<b>TMB</b>	Tetramethylbenzidine
		<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor
		<b>TS</b>	Tryptone sel
		<b>UFC</b>	Unité formant colonie
		<b>VBrif</b>	Vert brillant rifampicin
		<b>ZEA</b>	Zéaralénone

# **INTRODUCTION**

## CONTEXTE DE L'ÉTUDE

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires issus des moisissures appartenant principalement aux genres *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. ou *Penicillium* spp. Ces toxines se retrouvent à l'état de contaminants naturels dans de nombreuses denrées d'origine végétale, notamment les céréales, les fruits, noix, amandes, grains, fourrages ainsi que dans les aliments composés et manufacturés issus de ces filières destinés à l'alimentation humaine et animale. La consommation de denrées contaminées peut se révéler potentiellement toxique chez les animaux et chez l'homme.

L'occurrence des mycotoxines est différente selon les régions du globe, mais il s'agit d'un problème mondial de par les approvisionnements en matières premières et les échanges commerciaux. Sur plus de 300 mycotoxines actuellement recensées dans le monde, seules une trentaine possèdent de réelles propriétés toxiques préoccupantes. Les principales familles de mycotoxines sont les Aflatoxines (et l'Aflatoxine B1 plus particulièrement), les Fumonisines, la Zéaralène, les Ochratoxines et les Trichothécènes dont le déoxynivalénol (DON).

Les mycotoxines, et en particulier celles qui sont carcinogènes, devraient être exclues des aliments. La législation sur les mycotoxines se met progressivement en place, mais tous les pays n'en sont pas au même stade, car la fixation de doses maximales et la mise en place d'une législation dépendent de plusieurs facteurs à la fois scientifiques et socio-économiques. Dans l'Union Européenne, le règlement 2006/1881/CE de la commission du 19 décembre 2006 fixe des teneurs maximales pour certaines mycotoxines dans les denrées alimentaires pour l'alimentation humaine (Tableau 1). En ce qui concerne les aliments pour animaux, la directive 2002/32/CE modifiée fixe des teneurs maximales uniquement pour l'Aflatoxine B1. Pour les autres mycotoxines comme le DON, des teneurs maximales sont simplement recommandées par le texte 2006/576/CE de la commission du 17 août 2006, mais pas encore imposées.

Souvent retrouvé sur des céréales telles que le blé, l'orge, et le maïs, le DON est largement répandu au niveau mondial. Étant donné la proportion importante de céréales dans leur alimentation, les animaux de rentes sont particulièrement exposés à cette mycotoxine, et parmi les espèces animales concernées, le porc se révèle particulièrement sensible. Chez les porcs, les premiers effets d'une exposition au DON consistent en une baisse de consommation d'aliment, des performances de croissance et une altération des fonctions immunitaires et de la reproduction (Etienne et Wache, 2008).

**Tableau 1 :** Caractéristiques et réglementations en vigueur pour les principales mycotoxines retrouvées dans les céréales.

Mycotoxine	Stades les plus sensibles	Signes cliniques Lésions	Teneur maximale en µg/kg <sup>(1)</sup>	
			Porc <sup>(2)</sup>	Homme <sup>(3)</sup>
Aflatoxine B1	Porcelets Porcs à l'engraissement	Retard de croissances Toxicité et nécroses hépatique Dysfonctionnements immunitaires Hyperplasie des canaux biliaires	20	0,1 - 8
Déoxynivalénol	Porcs à l'engraissement Truies en finition	Refus alimentaires Retard de croissance, perte de poids Dysfonctionnements immunitaires	900	200 - 750
Fumonisine B1 et B2	Porcs et truies à tout âge	Œdèmes pulmonaires Dyspnées, cyanoses, mort en 2 à 4 heures Avortements Lésions hépatiques	5000	200 - 1000
Toxine T-2 et HT-2	Porcs à l'engraissement Truies en finition	Refus alimentaire Diarrhée, leucopénie, immunosuppression Ulcères buccaux et gastriques Déplétion lymphoïde et thymique	/	/
Ochratoxine A	Porcs à tout âge	Retard de croissance Polyuries-polydipsies Ulcères gastriques Hypertrophie et dysfonctionnement rénaux	50	0,5 - 10
Zéaralène	Truies prépubères Truies matures Jeunes verrats	Hyper-œstrogénisme chez les jeunes truies Pseudo-gestation, retard du cycle Diminution des chaleurs, vulvovaginite Avortement précoce Rétention du corps lutéal Réduction de la taille testiculaire	100 / 250 <sup>(4)</sup>	20 - 200

(1) Teneur maximale dans les denrées alimentaires, suivant le produit et son stade de transformation

(2) Recommandation 2006/576/CE de la commission du 17 août 2006, sauf pour l'Aflatoxine B1, dont la teneur est fixée par la Directive 2002/32/CE du 7 mai 2002

(3) Règlement 2006/1881/CE du 19 décembre 2006. Données présentées à titre de comparaison.

(4) Pour les porcelets et jeunes truies / pour les truies et les porcs à l'engraissement

La présence de DON dans l'alimentation des porcs peut entraîner des problèmes sanitaires et économiques importants pour les professionnels de la filière porcine. La sensibilité importante du porc vis-à-vis du DON nécessite donc une vigilance particulière pour cette espèce. Les effets observés sont variables et nombreux. Quant aux modes d'actions, ils ne sont pas encore bien connus et restent à être expliqués.

# ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE : LE DÉOXYNIVALÉNOL

## 1. Présentation générale

### 1.1. Production

Le DON est une mycotoxine de la famille des trichothécènes B, contaminant naturel des céréales et de leurs produits dérivés. Le DON a été isolé pour la première fois par une équipe japonaise à partir d'orge infectée par *Fusarium graminearum* (Morooka *et al.*, 1972). C'est à la suite de vomissements constatés sur des porcs ayant consommé du maïs contaminé par ce même champignon, que Vesonder *et al.* (1973) ont caractérisé le composé actif comme étant un trichothécène et lui ont donné le nom de « vomitoxine ».

Le DON est produit par les champignons *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum*, dont le développement est favorisé par certaines conditions de température et d'humidité. Lors d'une infection par *Fusarium* spp., le blé présente un aspect mou et ratatiné, souvent décoloré en rose. Sur les grains, le champignon est visible comme une moisissure rougeâtre sur la pointe de l'épi. Ces moisissures sont capables de résister à des conditions climatiques rigoureuses et leurs productions de toxines sont fortement stimulées par un passage à basse température ainsi qu'une grande humidité ambiante. Ces événements peuvent survenir en culture ou durant les récoltes, mais aussi lors d'un stockage en condition humide avant le séchage des grains.

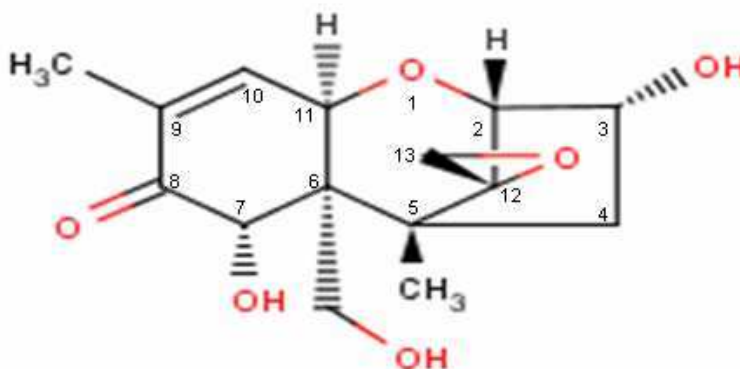
### 1.2. Distribution

Parmi l'ensemble des mycotoxines produites par *Fusarium* spp., le DON est un des contaminants les plus fréquents du blé, de l'orge et du maïs et, selon un récent rapport de la FAO (Food Agricultural Organisation), le plus largement répandu à travers le monde dans les denrées alimentaires (JECFA, 2007). A titre d'exemple, aux Etats Unis, des analyses faites entre 1993 et 2003, sur 2106 lots d'orge et 2524 de blé, ont montré que 47,1% et 40,4% des lots d'orge et de blé, respectivement, présentaient une contamination en DON supérieure à 1000 µg/kg (ppb) de céréales. Une étude réalisée en Russie sur 2166 échantillons de céréales prélevés entre 1989 et 2001 a montré que 69% des lots étudiés étaient contaminés par du DON (Tutelyan, 2004). Une étude réunissant l'ensemble des résultats relatifs aux contaminations de plusieurs récoltes céréalières issues de 12 pays européens a montré que

57% de 11022 échantillons de céréales (blé, orge, maïs, avoine, seigle) étaient contaminés par le DON, dont 7% avec des concentrations supérieures à 750 ppb (SCOOP, 2003).

### 1.3. Propriétés Physico-chimiques

Comme l'ensemble des trichothécènes B, le DON est un composé sesquiterpénique (15 atomes de carbone), possédant un squelette tricyclique, appelé trichothécane, formé d'un cyclopentane, d'un cyclohexane, d'un cycle à six chaînons oxygénés et de groupements méthyles. Il possède une double liaison en C<sub>9-10</sub>, une fonction cétone en C<sub>8</sub> ainsi qu'un groupement époxyde en C<sub>12-13</sub> caractéristique des 12,13 époxy-trichothécènes (Vidal, 1990). Comparé aux autres trichothécène B, Le DON présente un groupement hydroxyle (OH) en C<sub>3</sub> et en C<sub>7</sub> (Figure 1).



**Figure 1** : Structure chimique du déoxynivalénol (DON)

Le DON est un composé polaire très peu soluble dans l'eau, incolore, cristallisable, et soluble dans des solvants polaires (méthanol et acétonitrile aqueux). Son poids moléculaire est de 296,32 g/mol et il est chimiquement très stable, même conservé longtemps à température ambiante. De plus, il n'est pas dégradé pendant les procédés de moutures de grains, de stérilisation du lait (15 minutes à 118°C) ou de cuisson des aliments. Le DON est stable à 120°C, modérément stable à 180°C et se décompose en 30-40 minutes à 210°C (Vidal, 1990).



## 2. Mycotoxicooses

La consommation de produits contaminés par des trichothécènes peut provoquer, chez l'homme et l'animal, des maladies appelées mycotoxicooses, suite à une toxicité aiguë ou chronique des mycotoxines. Chez l'homme, la mycotoxicoose la plus connue associée à l'ingestion de céréales contaminées par *Fusarium* spp. a été rapportée dans les années 1940, où des cas graves d'Aleucie Toxique Alimentaire ont provoqué le décès de 10% de la population du district d'Orenburg. Cette pathologie est caractérisée par des diarrhées et des vomissements dans les premiers stades puis s'accompagne de leucopénies sévères, d'angine ulcéronécrotique, de septicémie et d'aplasie médullaire. Des années plus tard, ce phénomène a été attribué principalement à la consommation des champignons *Fusarium poae* et *sporotrichoïdes*, qui produisent un autre trichothécène, la toxine T-2 (Leonov, 1977).

Plus récemment, plusieurs cas de mycotoxicooses chez l'homme et des animaux d'élevage ont été attribués à la consommation de céréales contaminées par du DON au Japon (Morooka *et al.*, 1972). En Inde, le DON a également été mis en cause en tant qu'agent étiologique dans des intoxications chez des habitants de la vallée du Kashmir ayant consommé du pain fabriqué à partir de blé moisi (Bhat *et al.*, 1989). Les symptômes de la maladie incluaient des nausées, des douleurs gastriques, des vomissements et des irritations au niveau de la gorge.

Enfin, chez les animaux, les mycotoxicooses associées au DON sont principalement décrites chez le porc, les autres animaux étant beaucoup moins sensibles à son ingestion. Les principaux symptômes sont liés à un refus alimentaire et à des vomissements. Parmi les cas signalés, certains éleveurs australiens ont constaté un refus alimentaire chez des porcelets, une diminution de consommation alimentaire des porcs plus âgés ainsi qu'une apparition de vulves rouges et œdémateuses chez plusieurs truies de 30-50 kg. Les recherches effectuées sur l'aliment ont révélé la présence de zéaralène (ZEA) et de DON dans les céréales, concluant à une double intoxication des animaux, la ZEA provoquant les symptômes d'oestrogénisme et le DON le refus de l'aliment (Moore *et al.*, 1985). Durant l'été 1986 en Argentine, des porcs nourris avec plus de 40% de blé, après une saison froide et humide, ont présenté un refus alimentaire sévère associé à une chute de croissance des animaux. Les analyses ont démontré la présence de nombreuses souches de *Fusarium* et de niveaux de contamination variable de DON (1-20 ppm) dans le blé et l'aliment. Une reproduction expérimentale a démontré le rôle du DON dans le refus de l'aliment, entraînant également une congestion de la muqueuse de l'estomac et de l'intestin grêle, une dégénérescence hydropique des hépatocytes et une vacuolisation des cellules du tubule contourné distal

(Marpegan *et al.*, 1988). Ces effets sur les porcs seront plus particulièrement détaillés dans le dernier chapitre de cette partie bibliographique.

### **3. Toxicologie expérimentale**

De nombreuses études ont été réalisées sur des animaux de laboratoire afin de pouvoir évaluer plus précisément le risque concernant la santé publique lié à la présence éventuelle de DON dans les aliments. Bien que le modèle expérimental de notre étude soit le porc, nous présenterons ici quelques aspects généraux de la toxicité du DON.

#### 3.1. Absorption, élimination et métabolisme.

Le DON présente une biodisponibilité rapide chez les rongeurs. En effet, des proportions de 37% de doses orales de [<sup>14</sup>C] DON ont été retrouvées dans les urines de rat 24 heures après administration (Meky *et al.*, 2003). Chez la souris, les profils cinétiques de la distribution du DON dans le plasma, le rein et le foie sont semblables, avec une décroissance rapide suivie d'un palier à 24 heures (Azcona-Olivera *et al.*, 1995). A l'image des autres trichothécènes, la métabolisation du DON met en jeu des réactions de désestérification, de dé-époxydation et de conjugaison. La dé-époxydation représente l'étape la plus importante dans la détoxification du DON, car privé de son époxyde, ce dernier n'est quasiment plus toxique (Swanson *et al.*, 1988). Chez le rat, cette dé-époxydation est réalisée par la microflore gastro-intestinale. Après administration orale, le DON est dé-époxydé en DOM-1 (dé-époxydéoxynivalenol-1), par la flore intestinale et non par les microsomes hépatiques. Le DOM-1 est 50 fois moins toxique que la toxine d'origine (Worrell *et al.*, 1989; Eriksen *et al.*, 2003). Cette aptitude naturelle de la flore intestinale à dé-époxyder le DON comme d'autres trichothécènes B plus ou moins efficacement pourrait expliquer en partie les sensibilités différentes à ces toxines selon les espèces (Sundstol Eriksen *et al.*, 2004). En effet, le DON est peu métabolisé par la microflore intestinale du porc, et c'est également l'espèce animale la plus sensible à cette mycotoxine (Prelusky *et al.*, 1988).

### 3.2. Toxicité générale

Chez les souris, les valeurs des doses létales obtenues suite à une administration de DON par voie orale et par voie péritonéale sont de 78 et 49 mg/kg de poids vifs, respectivement. Des administrations intra-péritonéales de DON à des doses de 10 à 1000 mg/kg de poids vifs (PV) provoquent différents signes toxiques allant de la nécrose du tube digestif, de la moelle osseuse et des tissus lymphoïdes à des lésions cardiaques et rénales (Forsell *et al.*, 1987). En revanche, les études de la toxicité subaiguë et chronique (doses inférieures à 10 mg/kg PV), en absence de contaminants pathogènes, n'ont montré qu'une diminution des performances de croissance chez les rongeurs (Forsell *et al.*, 1986; Iverson *et al.*, 1995).

### 3.3. Carcinogénicité et génotoxicité

La carcinogénicité du DON a fait l'objet d'une évaluation par le Centre International de Recherche sur le Cancer, CIRC (IARC, 1993). Par un manque d'étude concernant la détermination de la carcinogénécité, le CIRC a classé le DON dans la catégorie 3 (c'est-à-dire ne présentant pas suffisamment de preuves expérimentales ou épidémiologiques pour apprécier leur carcinogénécité). Au niveau de son potentiel génotoxique, le DON ne provoque pas d'augmentation de la fréquence des mutations chez les bactéries ou dans les cultures cellulaires mais présente par contre un effet clastogénique puissant (Knasmuller *et al.*, 1997).

### 3.4. Reproduction

Chez les animaux de laboratoire, la reproduction expérimentale des mycotoxicoles provoquées par le DON a rarement mis en évidence des troubles de la fonction de reproduction ou des lésions de l'appareil génital. Chez le rat, l'administration de 20 ppm de DON n'a montré aucune altération particulière des organes génitaux, excepté une baisse de fertilité de 50% chez des femelles gestantes (Morrissey et Vesonder, 1985).

### 3.5. Flore intestinale

Pour l'ensemble des trichothécènes, très peu d'études *in vivo* ont été menées pour caractériser une potentielle interaction avec la flore intestinale des animaux. Tenk *et al.* (1982) ont observé une modification de la population des bactéries aérobies chez le rat et le

porc après l'administration intramusculaire de la toxine T-2. En revanche, de nombreuses études *in vitro* ont été menées dans le but d'étudier la détoxification du DON par des populations bactériennes intestinales spécifiques et de trouver ainsi de nouveaux composés biologiques capables de lier ou de dégrader le DON dans le milieu intestinal chez diverses espèces animales (Kollarczik *et al.*, 1994; Eriksen *et al.*, 2002; He *et al.*, 1992; Niderkorn *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2007).

### 3.6. Immunotoxicité

La toxicité du DON envers le système immunitaire a fait l'objet de nombreuses revues scientifiques (Rotter *et al.*, 1996; Pestka *et al.*, 2004; Pestka, 2008). Ce paragraphe présente ici un résumé des différents effets observés concernant les propriétés immunotoxiques du DON.

#### 3.6.1. Effets paradoxaux du DON sur les fonctions immunitaires

En fonction de la dose administrée et de la durée d'exposition, le DON présente des effets stimulateurs ou déprimeurs sur le système immunitaire. De fortes doses de DON vont provoquer une déplétion des globules blancs circulant, la réduction du taux d'IgM et IgG dans le sérum, la diminution de la résistance aux pathogènes et l'inhibition de la réponse antigénique (Pestka et Smolinski, 2005). L'effet immunosuppresseur du DON sur les fonctions des leucocytes a été caractérisé comme étant le résultat de l'induction de l'apoptose des cellules, phénomène mis en évidence après utilisation de différentes doses de DON, à la fois *in vivo* (Zhou *et al.*, 2000; Islam *et al.*, 2003) et *in vitro* pour les macrophages (Yang *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2003) et les lymphocytes B et T (Pestka *et al.*, 1994).

En revanche, de faibles doses de DON vont entraîner des effets immunostimulateurs telles qu'une élévation de la concentration en immunoglobulines A (IgA) plasmatiques, ainsi qu'une augmentation rapide et transitoire de l'expression de plusieurs gènes liés à l'immunité, comme les cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 (Ouyang *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1998; Sugita-Konishi et Pestka, 2001; Kinser *et al.*, 2004), le gène de la cyclooxygénase-2, COX-2 (Moon et Pestka, 2002), ou encore des chémokines MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein) et IL-8 (Sugita-Konishi et Pestka, 2001; Islam *et al.*, 2006; Gray et Pestka, 2007). De plus, ces effets peuvent être exacerbés par une exposition concomitante avec un agent inflammatoire tel que les lipopolysaccharides (LPS) bactériens,

lors de travaux *in vitro* (Wong *et al.*, 1998; Sugita-Konishi et Pestka, 2001; Chung *et al.*, 2003; Mbandi et Pestka, 2006) et *in vivo* (Zhou *et al.*, 2000; Islam *et al.*, 2002).

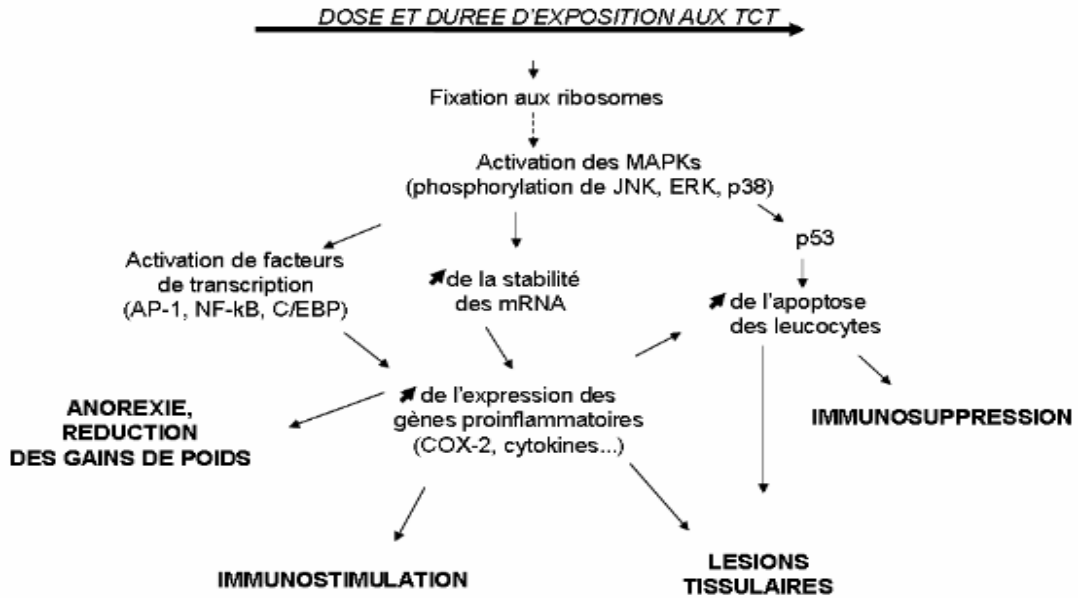
### 3.6.2. Cas particulier des IgA

L'augmentation de la concentration sérique en IgA a été décrite dans de nombreuses études suite à une exposition au DON chez les animaux de laboratoire, comme chez d'autres espèces animales (Pestka, 2003). Par conséquent, les IgA sériques sont généralement utilisées comme marqueur biologique d'une intoxication au DON. Les conséquences de cette élévation font apparaître des symptômes semblables à ceux d'une glomérulonéphropathie humaine à dépôt d'IgA (maladie de Berger). L'augmentation de la concentration en IgA est la conséquence de la libération de cytokine IL-6 par les lymphocytes T et les macrophages, induite par le DON (Pestka *et al.*, 2004). Ce phénomène est également observé chez des animaux d'élevage, comme les porcs (Pinton *et al.*, 2008).

### 3.6.3. Mécanismes moléculaires

Comme la plupart des trichothécènes, le DON a la capacité d'inhiber la synthèse des protéines en se fixant aux ribosomes. Ce phénomène est connu sous le nom de « ribotoxique stress response » (Iordanov *et al.*, 1997). Cette propriété des trichothécènes a été observée pour la première fois par Ueno et Fukushima (1968). La puissance de cette activité dépend de la nature des substitutions du trichothécène étudié et requiert la présence de la double liaison en position C<sub>9-10</sub> et l'intégrité du cycle 12,13-époxyde. Le DON se fixe sur la sous unité 60S des ribosomes eucaryotes et interfère avec l'activité de la peptidyltransférase, en inhibant le processus d'élongation de la protéine (Ehrlich et Daigle, 1987). L'un des effets indirects de ce phénomène est l'arrêt de la synthèse des acides nucléiques par le DON à des doses supérieures à celles requises pour l'inhibition protéique.

Depuis quelques années, les mécanismes moléculaires expliquant l'induction des gènes inflammatoires par le DON ont fait l'objet de nombreuses études, récemment répertoriées dans une revue bibliographique (Pestka, 2008). L'implication potentielle de tous ces mécanismes dans la modulation de la réponse immunitaire par le DON a été démontrée sur différents types cellulaires, sans qu'aucun de ces facteurs ne soit privilégié (Figure 2).



**Figure 2 :** Description des mécanismes moléculaires et des signaux de transduction impliqués dans la toxicité induite par le DON (d'après Pestka *et al.* (2004)).

AP-1 : Activator Protein-1; NF- B: Nuclear factor – B; C/EBP: CAAT Enhancer-Binding Protein; MAPKs : Mitogen-Activated Protein Kinases; JNK 1/2: c-Jun N-terminal Kinases; ERK 1/2: Extracellular Signal Regulated Protein Kinases; COX-2: cyclooxygenase-2.

Suivant les gènes considérés, de nombreuses études ont montré que le DON a la capacité de moduler l'activité des facteurs transcriptionnels ou post-transcriptionnels, notamment par :

- (1) Les facteurs de transcription NF- B (Nuclear Factor – B), AP-1 (Activator Protein-1) et C/EBP (CAAT Enhancer-Binding Protein) dans les lymphocytes T EL-4 (Ouyang *et al.*, 1996) ainsi que dans les extraits nucléaires des modèles cellulaires de macrophages RAW 264.7 de souris (Wong *et al.*, 2002) et de monocytes U937 humains (Gray et Pestka, 2007).
- (2) L'augmentation de la stabilité des ARN messagers des protéines de l'inflammation comme TNF (Chung *et al.*, 2003), COX-2 (Moon et Pestka, 2002) ou encore IL-6 (Jia *et al.*, 2006) chez les macrophages. Cet effet ne se retrouve cependant pas toujours, notamment pour IL-8 dans les monocytes (Gray et Pestka, 2007).
- (3) L'activation des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases), tels ERK (Extracellular Signal Regulated Protein Kinase), JNK1/2 (c-Jun N-terminal Kinase) et p38 MAPK (Pestka, 2008). Ces MAPKs jouent un rôle dans divers processus tels que la croissance cellulaire, la différenciation, l'apoptose et sont de très importants transducteurs de la réponse immunitaire.

#### **4. Effets biologiques et physiologiques du DON chez le porc**

Le porc est l'espèce animale la plus sensible à la présence de DON dans son alimentation. Dans le but de comprendre cette particularité, de nombreuses études ont été réalisées chez le porc, la plupart sur les effets sur les performances de croissance, mais de nombreuses questions subsistent sur les modes d'action du DON chez ces animaux. Dans ce dernier chapitre, les effets biologiques et physiologiques du DON chez le porc sont présentés sous forme d'une revue bibliographique. Les effets du DON sur les performances de croissance et sur la reproduction des porcs sont tout d'abord présentés. Une synthèse de l'impact du DON sur l'ensemble de la réponse immunitaire est détaillée. Enfin, le métabolisme et la toxicologie d'organe après ingestion d'aliment contaminé en DON par les porcs sont abordés.

**Cette revue, écrite en collaboration avec Michel Etienne, fait l'objet d'un chapitre dans l'ouvrage « *Mycotoxins in Farm Animals* » édité par Isabelle Oswald et Ionelia Taranu, paru en 2008.**

Transworld Research Network  
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India



Mycotoxins in Farm Animals, 2008: 000-000 ISBN: 978-81-7895-312-0  
Editors: Isabella Oswald and Ionelia Taranu

# 6

## Biological and physiological effects of deoxynivalenol (DON) in the pig

Michel Étienne<sup>1</sup> and Yann Wache<sup>2</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR 1079, Systèmes d'Élevage, Nutrition Animale et Humaine 35590 Saint-Gilles, France; <sup>2</sup>INRA, UR 66, Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, 31931 Toulouse, France. E-mail: ywache@toulouse.inra.fr

### Abstract

*Deoxynivalenol (DON) decreases the feed intake (-4.3%.g DON<sup>1</sup>.kg feed<sup>1</sup>) and growth rate (-7%.g DON<sup>1</sup>.kg feed<sup>1</sup>) of pigs when the level exceeds 1 mg/kg feed, and only high doses of DON cause vomiting. These consequences are related to the concentration of DON in the diet, but they become lessened from the 2<sup>nd</sup>-3<sup>rd</sup> week of intake of the contaminated diet for DON levels not greater than 4 mg/kg feed. DON has the same effects on sows, although reproductive performances do not seem to be affected, at least during one reproduction cycle. Effects on haematological parameters*

Correspondence/Reprint request: Dr. Michel Étienne, INRA, UMR 1079, Systèmes d'Élevage, Nutrition Animale et Humaine, 35590 Saint-Gilles, France. E-mail: etienne@st-gilles.rennes.inra.fr



*and on some metabolite, hormone or enzyme levels in blood serum are limited. Occasional changes in erythrocyte, leukocyte or platelet count, haematocrit, or haemoglobin concentration have been found. In many experiments, DON increases IgA concentrations in blood serum, generally when DON levels exceed 1 mg/kg feed. Non-specific lymphocyte proliferation capacity is sometimes increased. However, in some studies, proliferation was reduced when pigs were challenged with some antigens. Slight alterations of stomach and small intestinal mucosa are sometimes observed. DON is absorbed rapidly and efficiently, readily distributed in the body, and is poorly metabolized, i.e. detoxified, in pigs. This may explain why pigs are more sensitive to DON than other domestic species. DON is rapidly and almost completely eliminated within 24 h, and therefore only traces of DON are still found in pig tissues after a 12-24 h fast. As such, this mycotoxin is not a risk for human pork consumers.*

## **Introduction**

Deoxynivalenol (DON) belongs to the B group of trichothecenes. DON is a product of the secondary metabolism of some strains of *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*) whose development on cereals depends on weather and is favoured by rain around flowering and by low temperatures. Throughout the world, DON is one of the most common trichothecenes. It is frequently found on cereals and their by-products: a survey showed that in 11 European countries, 57% of the 11,022 analyzed samples were contaminated with DON (61% for wheat, 47% for barley, 89% for maize samples) at varied levels, with 50 mg/kg as a maximum [1]. However, only 7% of these samples had at least 0.75 mg DON/kg. This mycotoxin remains after disappearance of the mould and withstands heat.

Cellular and molecular effects of trichothecenes were reviewed by Pestka and Smolinski [2]. Trichothecenes bind to eukaryotic ribosomes and inhibit protein synthesis. Other toxic mechanisms resulting from trichothecenes have been suggested (impaired membrane function, altered intercellular communication, deregulation of calcium homeostasis). Recent studies suggest that early alterations in cell signalling, particularly at the level of mitogen activated protein kinases (MAPKs) are critical to trichothecene toxicity. Possible intermediate signals between trichothecene mycotoxins and MAPK activation might be the inhibition of double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR), the inhibition of haematopoietic cell kinase (Hck), and/or the generation of reactive oxygen species.

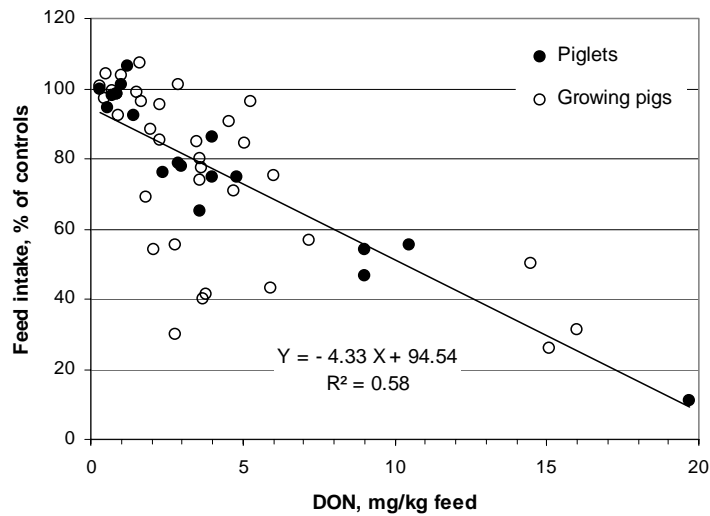
Numerous cases of toxicity were described in pigs fed cereals contaminated with *Fusarium*, especially in the United States [3,4,5,6], in Canada [7,8], and Australia [9]. Symptoms were similar to those observed in

men in analogous circumstances [10]. DON was first identified after the observation of vomiting in pigs fed maize contaminated with *Fusarium graminearum*. DON was the mycotoxin responsible for this effect, and was originally called vomitoxin [11]. Swine are more sensitive to trichothecenes than rats [12], poultry, and especially cattle which seem to be more tolerant [13,14,15]. The zootechnical, biological and physiological effects of DON in pigs will be considered in this paper.

## 1. Effects on feed intake

The most obvious effect of DON in pigs is the decrease of feed intake. In both piglets and growing pigs, decreased feed intake is not observed for DON levels below 1 mg/kg feed. For higher levels, the magnitude of the decrease is related to the concentration of DON in the diet and for instance, piglets no longer eat when their diet contains 12 mg DON/kg [16]. However, whatever the contamination level, the decrease in feed intake is highly variable between pigs fed the same diet, as well with a low [17,18] or a high DON concentration [19,20]. In piglets, this effect usually persists during the whole experiment (3 to 8 weeks) for DON levels above 3 mg/kg feed [21,22,23], whereas a normal intake tends to be recovered after 1 or 2 weeks for lower DON levels [23,24]. Similarly, a normal feed intake tends to be restored in growing-finishing pigs after 1 week for DON concentrations lower than 4 mg/kg feed, [17,18,24,25], whereas it remains decreased during the whole experimental period (6-12 weeks) for higher DON levels [19,26,27,28,29]. Feed intake is restored in piglets after the change from a diet contaminated with DON to a non-contaminated one [30].

Literature data related to the effects of the level of DON in the diet on feed intake are compiled in Figure 1. They indicate a 4.3% decrease in feed intake for each mg DON/kg diet increase. This value is similar for piglets and growing-fattening pigs (4.6 and 4.0%, respectively), but the relationship between DON concentration and feed intake decrease is closer for young ( $R^2=0.90$ ) than for older pigs ( $R^2=0.42$ ). The difference may be explained by the greater duration of experiments, and thus a more variable opportunity of recovery of intake, in the older animals. Important decreases of feed intake were however sometimes observed in growing pigs with DON concentrations lower than 5 mg/kg diet [25]. Other mycotoxins than DON may have been present in some naturally contaminated diets. Moreover, although methods for DON determination in feeds have been improved, some inaccuracy remains. Unlike what “vomitoxin” suggests, there were very few trials in which DON caused vomiting. In fact, vomiting was observed experimentally for very high DON doses given to 9-15 kg piglets only: for an intake of at least 50  $\mu\text{g}$  [31,32], 0.1 to 0.2 mg [26], or 0.3 mg DON/kg BW [33], or with a diet with 20



**Figure 1.** Effects of DON levels in the diet (X) on feed intake of piglets and growing-fattening pigs (Y). Based on the data obtained with less than 20 mg DON/kg feed by [16,17,18,19,20,22,23,24,25,26,27,28,29,30,41,45,46,47,48,72,77].

mg DON/kg [16]. Chewing, grinding of teeth and increasing salivation was observed within 3 min, and vomiting 7-22 min following the intravenous injection of 0.25 mg DON/kg BW [34]. Coppock *et al.* [35] reported that episodes of emesis occurred from 6-7 min and were followed by diarrhoea, muscular weakness and tremors after injection of 0.5 mg DON/kg BW.

The effects of DON, and more generally of trichothecenes, on feed intake and emesis in pigs seem to involve brain transmitters. In pigs fitted with an intracerebral catheter, Prelusky *et al.* [36] showed that  $^{14}\text{C}$  DON appears very rapidly in the cerebral spinal fluid (CSF), less than 2.5 min after intragastric infusion. Compared to sheep, the toxin peak level was delayed and maintained longer, and about 2.5 times more DON crossed the blood-CSF barrier in pigs. The slower rate of diffusion of DON in pigs may be related to its extended distribution in pig tissues whereas in sheep, the toxin is confined essentially to the extracellular compartment. This could explain the greater sensitivity of pigs to DON. A direct effect of DON on brain transmitters was considered. However, it was shown *in vitro* on membranes homogenates from different brain regions that DON as well as trichothecenes from the A group (T2 toxin, diacetoxyscirpenol) have a  $10^3$  to  $10^6$  weaker affinity for serotonergic receptors than ligands that have a high affinity [37]. The pharmacological effects of DON would then not be mediated by its functional interaction with serotonergic receptors.

The main brain transmitters were measured in 5 brain regions after pigs were euthanized at different times following an intravenous injection of 0.25 mg DON/kg BW [34]. The results depend on the transmitter, the time

following injection, and the brain region. The authors suggest that the neurological effects observed might not be related to the anorexic activity of DON, but to other toxicological events related to acute DON exposure, such as vomiting. Repeated intravenous or intragastric administration of sub-acute DON doses that did not cause vomiting induced important variations of catecholamines and their metabolites in CSF [38]. A rapid and sustained increase in 5-hydroxyindolacetic acid, a metabolite of serotonin, and a delayed increase in homovanillyl alcohol, a metabolite of dopamine, were observed after intragastric administration of DON. Homovanillic acid concentration decreased after intravenous dosing, demonstrating alterations in dopaminergic activity. Swamy *et al.* [39] also reported altered neurotransmitter concentrations in some parts of the brains of piglets fed a diet contaminated with DON and fusaric acid during 3 weeks: increase of cortex serotonin, decrease of norepinephrine in hypothalamus and of dopamine and homovanillic acid in pons. The possible role of tryptophan, which is a precursor of serotonin, has been considered in these changes [38,40]. Indeed, due to its inhibitory effect on protein synthesis, DON would increase aminoacidemia, and thus augment blood tryptophan levels. Tryptophan uptake in the brain and in turn serotonin synthesis would then be increased. However, Prelusky [41] did not find changes in peripheral blood plasma levels of serotonin, 5-hydroxyindolacetic acid or tryptophan during the 8 h following the intravenous or intragastric infusion of low or high DON doses in pigs. No peripheral effect of DON could then account for the increased serotonergic activity associated with decreased feed intake or emesis. Prelusky and Trenholm [33] showed *in vivo* that some specific serotonin receptor antagonists can efficiently prevent DON-induced emesis in pigs. Some anticholinergic compounds were also efficient, but they seemed to act directly at the emetic centre and prevented vomiting whatever the cause.

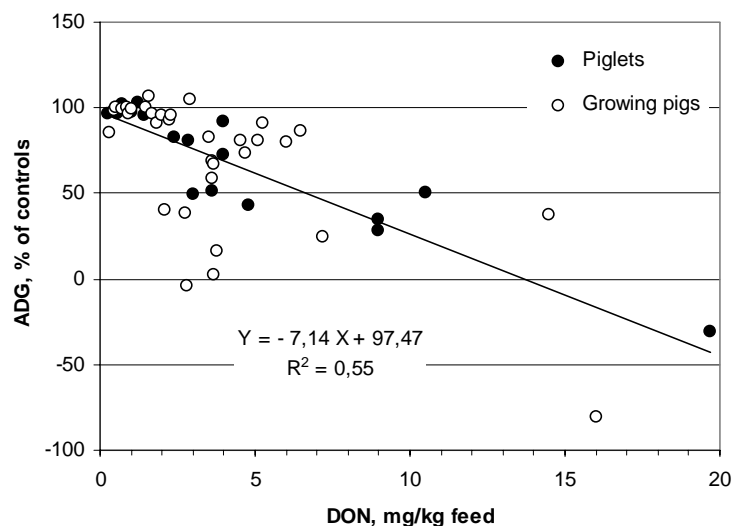
More recently, *in vitro* experiments suggest that at low doses, decreased feed intake seems to be attributable to the stimulation of the synthesis of pro-inflammatory cytokines under practical conditions, as IL-6 is known to induce anorexia, whilst at higher concentrations, vomiting is triggered by the interaction of DON with serotonergic and dopaminergic receptors [42].

## 2 . Effects on growth performance

As a consequence of decreased feed intake, DON alters the growth rate of pigs. This effect is related to the level of DON and like feed intake, it is reduced from the 2<sup>nd</sup> week for diets with less than 4 mg DON/kg [17,25,28]. A normal growth rate can even be recovered for levels of 2.3 to 3 mg DON/kg feed [24,43], whereas it remains decreased until slaughter at higher concentrations [18,10,25,28]. In a literature survey, Dersjant-Li *et al.* [44] concluded that during the first week of feeding a naturally contaminated diet,

the growth rate decreased by 5% with 0.6 mg DON/kg feed, and the marginal reduction of growth rate was 8.5% for each mg of DON/kg increase. A pair-fed group in which pigs are fed the same amount of the control diet than that eaten by the pigs of the contaminated group was sometimes included in trials. In most cases, the effects on growth rate were similar for these two groups [22,27,29,45,46]. Moreover, feed intake and growth rate of pigs were improved when energy and protein concentrations in the contaminated diets were increased [27]. The effects of DON on the growth rate of pigs results then from lower feed intake, and not from an alteration of their metabolism. Some reports however contradict this conclusion. According to Rotter *et al.* [43], the growth rate of the pair-fed pigs was lower than that of pigs fed a diet that contained 3 mg DON/kg. Prelusky [47] showed that for a similar reduction of their feed intake, the growth rate was decreased to a lesser extent when the same DON dose was administrated to pigs via an intraperitoneal infusion than via the feed, particularly for the high DON doses. Otherwise, according to Côté *et al.* [21], castrated males had a lower growth rate than females fed the same contaminated diet, whereas Friend *et al.* [19] did not find any significant difference between barrows and female pigs.

Calculations from the literature data obtained with DON levels not exceeding 20 mg/kg in feed show that the growth rate of pigs was reduced by about 7% for each mg DON/kg increase in the diet (Figure 2). The slope of the relationship is slightly greater for growing-finishing pigs than for piglets (7.7 vs. 6.7%) and, very likely for the same reasons than for feed intake, the relationship is closer for piglets than for older pigs ( $R^2 = 0.85$  vs. 0.44).



**Figure 2.** Effects of DON levels in the diet (X) on average daily gain of piglets and growing-fattening pigs (Y). Based on the data obtained with less than 20 mg DON/kg feed by [16,17,18,19,20,22,23,24,25,27,28,29,30,45,46,47,48,49,72,77].

Some experiments suggest that for a given DON intake, consequences are greater when a naturally contaminated diet is used than when purified DON is added [19,25,26]. For instance, Trenholm *et al.* [48] reported differences of 18 and 23% in feed intake and growth rate between the two forms, respectively. With a feed containing 3 mg DON/kg, the growth rate remained decreased during 32 days when the feed was naturally contaminated, whereas the growth rate returned to that of the controls after the 1<sup>st</sup> week when purified DON was used [49]. In their literature review, Dersjant-Li *et al.* [44] calculated that a diet with 1.8 mg purified DON/kg led to the same 5% growth rate decrease than a naturally contaminated diet with 0.6 mg DON/kg, but the marginal growth rate reduction was similar for the two DON origins (8% and 8.5%.mg DON<sup>-1</sup>.kg feed<sup>-1</sup> for the purified and natural forms, respectively). It is often assumed that the difference could be due to the presence of some chemicals or other mycotoxins in the naturally contaminated diet, even if they are not detected. The difference could also be attributed to an underestimation of the DON level in the naturally contaminated diet due to the complexity of the matrix in which the toxin is measured, or to differences in rapidity and extent of digestive absorption between the two sources.

According to Dersjant-Li *et al.* [44], a decreased feed efficiency also contributes to the lower growth rate of pigs ingesting DON. In fact, feed efficiency was not altered in studies in which diets with less than 4 [23,30,50], 4.7 [51], or 6.5 mg DON/kg [46] were fed. Rotter *et al.* [43] even concluded that feed efficiency tended to be improved linearly when DON levels in feed increased from 0 to 2.85 mg/kg. Under these conditions, DON would have the same effect on efficiency than a moderate feed restriction. Conversely, Bergsjø *et al.* [18,28] found a decreased feed efficiency during the whole fattening period (25 to 100 kg BW) when the diet contained 3.5 and 4 mg DON/kg. According to He *et al.* [45], feed efficiency was decreased by 45% in piglets fed a diet containing 5 mg DON/kg, but this value was obtained during a period that was too short to be significant.

Nitrogen retention did not differ between growing pigs fed naturally contaminated diets with 3.7 [52] or 5.3 mg DON/kg [20] and those fed a safe diet. Increased nitrogen retention was even measured in pigs fed a diet with 6.5 mg DON/kg. However, the inhibitory effect of DON on protein synthesis shown in mice and laying hens has also been evidenced in pig kidney, spleen and ileum, but not in other organs like liver, duodenum or jejunum or in muscle [53].

### **3. Effects on pig reproduction**

Few studies have investigated the effects of DON on pig reproduction. After feeding a diet with 4 mg DON/kg to young pigs during 7 weeks, the diameter of the seminiferous tubules and the spermatogenesis score of the

boars and the number of antral follicles in the ovaries of the females did not reveal any significant effect on their sexual maturation [19]. Five experiments were done on reproductive primiparous sows: from mating to 52 days of gestation [54], between 91 days of gestation and farrowing [55], and during a whole gestation-lactation cycle [50,56,57]. The consequences of DON on feed intake depended on the feeding level. During pregnancy, no difference was shown for DON levels up to 6.2 mg/kg diet in restricted sows (2 to 2.8 kg/day) [50,55,56,57], but compared to controls fed a non contaminated diet, feed intake was reduced if sows were fed *ad libitum* a diet with 3.5 mg DON/kg [54]. Similarly, feed intake of lactating sows restrictively fed in comparison with their requirements was not affected by DON [50,56], whereas it was reduced by 21% in comparison with *ad libitum* controls when the diet contained 2 mg DON/kg [57]. The variability between animals was high: in the experiments of Friend *et al.* [56] and Etienne *et al.* [57], some sows did not eat at all during several days and were discarded, whereas the remaining sows were much less affected.

The consequences of DON on sow body reserves depend on its effect on appetite: the weight gain during pregnancy was reduced [54] and the weight loss during lactation was increased [57] when DON decreased feed intake, whereas these criteria were not affected in other studies where appetite was not affected.

Apart from the report by Friend *et al.* [54] in which 3.5 mg DON/kg feed tended to reduce the weight and length of 52-day-old foetuses, the number and weight of piglets at birth, their survival rate, and their growth rate until weaning were not affected by feeding a diet contaminated with DON to their dams. According to Diaz-Llano and Smith [55], the number of live piglets per litter was not affected in sows fed a diet with 5.7 mg DON/kg during the two last weeks of pregnancy, but the number of stillborn piglets was increased. However, this result needs to be confirmed with a greater number of sows. Finally, only traces of DON were recovered in the milk of sows fed a contaminated diet [56,57].

#### **4. Effects on haematology and blood chemical measurements**

The effects of DON intake on most haematological measurements and on metabolite, hormone and enzyme blood levels in pigs are rather limited and sometimes contradictory. Consequently, no blood parameter can be used as an indicator of DON levels occurrence in feed. Haematology of piglets fed diets with 0.28 to 4.5 mg DON/kg during 3 to 6 weeks was not affected [29,43,58,59,60]. However, occasional changes in the number of erythrocytes and of platelets, in hematocrit [49], and an increased number of leucocytes

compared to pair fed controls [43] were observed with 3 mg DON/kg feed. Lun *et al.* [22] reported decreased haemoglobin levels and hematocrit in pigs fed a diet with 10.5 mg DON/kg, but the same effects were noticed in pair-fed pigs on the non contaminated diet. For a 4.6 mg DON/kg concentration, a significant reduction of mean corpuscular volume and of mean corpuscular haemoglobin was found [61].

Blood urea and creatinine were not affected by DON levels between 0.28 and 19 mg/kg of feed [22,27,48,49,52,58,59,60]. However, serum protein and albumin were decreased in pigs fed a diet with 3.5 mg DON/kg between 21 and 101 kg [18]. For similar doses, serum protein and  $\gamma$ -globulin [43,49] and  $\gamma$ -globulin [29] were reduced. According to Rotter *et al.* [29] and Eriksen and Pettersson [15], these changes could be related to a decrease in protein synthesis induced by DON. A decreased glycaemia was found by Coppock *et al.* [35]. Lower calcium and phosphorus levels and higher chloride concentrations in serum were reported by Swamy *et al.* [61], but in other experiments, DON did not significantly affect ion levels [49,55,60]. The activity of several liver enzymes was not changed with feeds containing levels of DON up to 4 mg/kg were fed [22,49,52,55,59,60].

## 5. Immunological effects

Immunotoxic effects of DON have been extensively investigated in rodents [62]. This mycotoxin can be either immunosuppressive or immunostimulatory depending on the dose and the length of exposure [62]. Studies concerning pigs are much less numerous and mainly concern the production of IgA.

### 5.1. Effects of DON on the innate immune response

The innate immune response involves both immune cells (macrophages, neutrophils, dendritic cells) and non-immune cells such as epithelial cells. Due to their localisation, these latter cells constitute one of the first defence lines of the body [63]. In pigs, *in vitro* and *ex vivo* data suggest that DON decreases the barrier function of intestinal epithelial cells with a concomitant increase of bacterial translocation [64]. Very few studies have investigated the effect of DON on porcine phagocytes. Animals fed for 4 weeks with low doses of DON (up to 840  $\mu\text{g}/\text{kg}$  feed) showed no variation in the number of circulating neutrophils [60] but when higher concentration were used (3000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  feed, 4 weeks) an increase of circulating neutrophils was observed [43]. *In vitro* exposure of porcine neutrophils to DON led to a decreased oxidative burst as measured by chemiluminescence [65] and a decreased production of IL-8 [66]. By contrast, the random migration of porcine neutrophils was not affected by *in vitro* treatment with DON [65].



## 5.2. Effect of DON on serum immunoglobulin concentration

In pigs as in mice, one of the most pronounced effects of DON is an elevation of total immunoglobulin A (IgA) in the serum [62,67]. Serum IgA increased when piglets received feed contaminated with DON at 1 mg/kg [68], 1.4 to 2.9 mg/kg [30], 2.5 mg/kg [69], 3.9 mg/kg [23], 5.5 mg/kg [61], 5.7 mg/kg [70] or 6.2-6.8 mg/kg [46]. The same effects were observed with lower contamination levels of 0.6 or 0.8 mg/kg feed [60,71]. A few studies have also demonstrated that plasmatic IgA concentrations remained unchanged when piglets were fed a diet contaminated with 0.84 mg/kg of DON for 4 weeks [30] or with 4 mg/kg of DON for up to 12 weeks [28,52].

It should be noted that increased plasmatic IgA was only observed when piglets were fed a contaminated diet (1.6 mg de DON/kg feed) during the growing period but not during the finishing period. Moreover, this effect disappeared when the animals returned to control uncontaminated feed [72].

Parallel to an upregulation of IgA, purified DON caused a decrease in serum concentration of IgM and IgG levels in mice [62]. In swine, few studies have analyzed the effect of DON on the concentration of these subtypes of immunoglobulin, and results are not consistent between experiments.

In mice, chronic exposure to feed contaminated with 25µg/kg DON also enhances the specific IgA responses to intestinal and self antigens as well as viral infectious disease ([62,73,74]. In swine a similar increase in specific IgA was observed in pigs fed for 2 to 9 weeks with 2.5 mg DON/kg feed and immunized with ovalbumin [69]. This elevation of specific IgA was not associated with an increase in total specific antibody titer to any vaccine antigen [43,51,70]. A decreased level of specific antigen has also been observed after immunization with SRBC or tetanus toxoid [43,51].

## 5.3. Effect of DON on lymphocyte proliferation

*In vitro* treatment of pig lymphocytes with DON induced a dose dependant decrease of lymphocyte proliferation [70,75]. The effect of dietary exposure of pigs to DON is less clear and in most studies, no significant effect on mitogen-induced lymphocyte proliferation was observed [23,30,43,51,60,69]. One study indicated a decreased spontaneous and Con-A-induced proliferation in peripheral blood lymphocytes. Goyarts *et al.* [70] described a decreased proliferation of ConA stimulated peripheral blood lymphocytes from pigs exposed for 4 weeks to 5.7 mgDON/kg contaminated feed. By contrast, Pinton *et al.* [72] observed an increase of mitogen activities of lymphocytes in growing pigs receiving naturally contaminated diet with 1.6 ppm DON after 5 weeks exposure, but this effect disappeared in the finishing period 6 weeks later. Øvernes *et al.* [51] also observed an increased proliferative response of

porcine lymphocytes from pigs fed for 9 weeks a contaminated diet but this effect was only seen with one out the three mitogens tested.

#### **5.4. Effect of DON on cytokine synthesis**

In pigs, there are very few reports concerning the effect of DON on cytokine production, and no differences were detected in these studies [23,30,60].

### **6. Effects of don on organs and tissues**

After an acute dose (injection of 0.5 mg DON/kg BW), pancreatic acinar and islet cell necrosis and mild lympholysis of the mesenteric lymph nodes were observed [35]. But in most studies, oral doses of up to 6 mg/kg of DON in feed [13,24,54,59], caused no changes in the weight or appearance of organs (heart, liver, kidneys, spleen, bladder, adrenals, uterus) in pigs. This was even found in sows fed a diet containing 6.2 [56] or 2 mg DON/kg [57] during a whole reproductive cycle. By contrast, a greater relative weight of liver was observed when the DON concentration in feed was increased from 2.9 to 8.8 mg/kg [18,20,48]. Similarly, an increased weight of kidneys was noted at DON concentrations between 2.9 and 3.9 mg DON/kg [20,43,48]. In pigs fed a diet contaminated with DON and zearalenone, Tiemann *et al.* [76] showed that despite the absence of clinical signs, histopathological results provide evidence of liver dysfunction which can impair the hepatic circulation. According to Trenholm *et al.* [13], the relative stomach weight increased between 0 and 5 mg DON/kg feed. When a diet containing 3 mg DON/kg was fed to piglets during 4 weeks, the thyroid weight was decreased, the blood level of the thyroid hormone T<sub>4</sub> was increased, whereas that of T<sub>3</sub> remained unchanged [43]. This result may be connected with the observation that pigs fed a diet contaminated with DON had a lower skin temperature [43,49].

Examination of the digestive tract has been mostly done owing to the effects of trichothecenes on gross pathology and histology. Reddening of mucosa of the stomach fundus and of the small intestine, and mild to moderate enlargement and edema of the mesenteric lymph nodes was described in piglets fed a diet with 0.7 to 5.8 mg DON/kg [21]. Histology showed vascular congestion of stomach and intestinal mucosa, erosion of the squamous part of the stomach, mild degeneration of epithelial cells of the fundic mucosa, and mild to moderate lymphoid degeneration and necrosis of the lymphoid elements in Peyer's patches of the intestine and bronchial and mesenteric lymph nodes accompanied by mild lymphoid depletion. However, in general, the consequences were rather limited for DON feed levels from 0.6 to 19 mg/kg: mucosa discoloration in the cardiac area of the stomach [17,77], more corrugated appearance of the oesophageal and fundic areas of the stomach with

folding increasing as a function of dietary DON [13,29,43,48,78], thickening and keratinisation [13] or thinning and erosion of the stomach mucosa [48]. In some trials, no change in the stomach appearance was found with diets containing up to 4.7 mg DON/kg fed during an extended periods [51,54]. Paradoxically, some stomach areas sometimes appeared even less inflamed and healthier with the contaminated diet than with the control diet [19,48,78].

## 7. Transfer of DON in pig tissues

### 7.1. Absorption

A great proportion of DON is absorbed in pigs. Based on 5-day digestibility measurements on pigs that ingested about 0.10 mg DON/kg BW, Friend *et al.* [19] recovered at least 67% of the toxin plus non-toxic de-epoxy DON (DOM1) in urine. A similar value (68%) was obtained by Prelusky *et al.* [79] after intragastric infusion of <sup>14</sup>C labelled DON. Coppock *et al.* [35] found lower and more variable values (28 and 57%) depending on the rate of urine excretion in pigs injected with 0.5 mg DON/kg BW. According to their results, DON is secreted and reabsorbed in the renal tubules, and the authors suggest that decreased water intake of pigs ingesting DON would contribute to its toxicity. Intestinal absorption of DON is rapid: it appeared in blood 2.5 min after its intragastric infusion [36]. Plasma peak concentrations of DON were reached after 15-30 min, and levels remained elevated for approximately 9 h [79]. According to Dänicke *et al.* [80], the peak level of DON in plasma was reached 4.1 h after ingestion of a diet containing 4.2 mg DON/kg.

### 7.2. Metabolism

DON is almost not metabolized in pigs: more than 95% of the labelled DON injected to pigs was excreted without being transformed and less than 5% was found as DOM1 [79]. According to Friend *et al.* [20], 8% of the ingested DON was excreted as DOM1 in urine and faeces, and the remainder was not modified. The proportion of DOM1 in urine rises as the concentration of DON in feed increases, but the maximum reached was 4% only for a level of 3.7 mg DON/kg [52]. DOM1 was found in urine, not in bile [81]. Côté *et al.* [82] showed that when DON is incubated with pig liver microsomes, it does not disappear and no glucuronide conjugate is formed. DON is then neither bioactivated to a more toxic intermediate nor oxidized to a less toxic product in liver.

Coppock *et al.* [35] concluded that the disappearance of DON from plasma can be described with a one-compartment model, with 2.08 to 3.65 hours as half-life. Prelusky *et al.* [36,79] found that the elimination of radioactivity from plasma after the intravenous injection of labelled DON is best described by a three-compartment open model with a very rapid early distribution phase (half-life 5.8 or 5.2 min), followed by a slower distribution phase (half-life 97

or 66 min), and a prolonged elimination phase (half-life 510 or 251 min). The plasma clearance was 1.81 mL/min [79]. The apparent volume of distribution was about 1.3 L/kg: 1.24 to 1.46 L/kg [35], 1.13 L/kg [79], and 1.34 L/kg [36]. It was much higher than the volume of the extra-cellular liquid (about 0.17 L/kg). These data show that in pigs, DON is rapidly and efficiently absorbed, extensively distributed throughout the body, and poorly metabolized, i.e. detoxified [79]. This explains why pigs are so sensitive to DON, compared to other more tolerant species which absorb DON very poorly and/or metabolize DON extensively and rapidly.

Evolution of DON content in tissues and organs was studied in pigs weighing about 20 kg that were given a single intravenous dose of 1 mg DON/kg BW [83]. The pigs were sacrificed at 20 min, 1, 3, 8 or 24 h post injection. DON was measured in all tissues at 20 min and maximal concentrations were found at 20 min and 1 h, except in plasma and liver where peaks were very likely reached earlier. The higher levels (1 to 2 µg/g fresh tissue) were found in blood plasma, kidneys and liver as well as in urine and bile, surely because of the role of these organs in the elimination of xenobiotics. Slightly lower DON concentrations were measured in fat, lymph, lungs and adrenals, whereas levels in spleen, testes, brain, heart, muscle, skin, intestine and pancreas were much lower (20 to 165 ng/g). The relatively high concentrations reached in backfat and abdominal fat were unexpected because the physical characteristics of DON would not indicate an affinity to fat. Approximately 1/5 of the residues found in main organs were in fat, but this represented only 4% of the infused dose (35-45 µg/kg). Residues are thus not extensively accumulated in tissues, and the great volume of distribution of the toxin would be related to its large partition in the body and to a rapid but limited and temporary sequestration in some tissues [83,84].

### 7.3. Excretion and residues

Absorbed DON is mainly eliminated in urine. According to Prelusky *et al.* [79], 93.6% of the radiolabelled DON injected intravenously was recovered in urine and 3.5% in bile, which shows that some toxin did undergo hepatic excretion. Only trace levels were detected in faeces. Following its intragastric administration, 68% of DON was recovered in urine and 2% in bile, and much of the rest was found in faeces (20%). Peak elimination periods after dosing were observed from 1 to 3 hours and from 1 to 4 hours for urine and bile, respectively. DOM1 appeared in increasing proportions in the digestive contents from the distal small intestine and reached about 80% of the sum of DON and DOM1 in faeces collected from rectum [80]. It was concluded that de-epoxydation of DON, which primarily occurs in the hindgut, probably does not contribute much to detoxification in the pig.

**Table 1.** Main effects of DON in swine.

Criteria	Observations	DON level (mg/kg feed)
Feed intake	decrease	if > 1 mg/kg - 4 to - 5 % .mg DON <sup>-1</sup> .kg <sup>-1</sup>
Growth rate	decrease	if > 1 mg/kg - 7 % .mg DON <sup>-1</sup> .kg <sup>-1</sup>
Feed efficiency	no effect, even improvement	< 3 mg/kg
Nitrogen retention	no effect or decrease no effect improvement	> 3 mg/kg 3.7 et 5.3 mg/kg 6.5 mg/kg
Reproduction	no effect on sexual development ↘ feed intake ↘ body reserves of sows no effect on piglet birth weight no effect on number piglets born alive ↗ number stillborn ?? traces of DON in milk	4 mg/kg 2 and 3.5 mg/kg if feed intake reduced from 2 to 6.2 mg/kg from 2 to 6.2 mg/kg 5.7 mg/kg 2, 3.8, 6.2 mg/kg
Blood parameters	<i>limited and inconsistent effects:</i> ↘ of leucocytes ↘ of haemoglobin ↘ protein, albumin, globulin ↗ T4	3 mg/kg 10.5 mg/kg 3.5 mg/kg 3 mg/kg
Immune function	↗ of total IgA <i>occasional effects for other parameters:</i> ↗ or ↘ of IgG ↗ or no effect on lymphocyte proliferation <i>Sometimes after vaccination or immune challenge:</i> ↗ anti-ovalbumin IgA and IgG ↘ antibodies against SRBC or tetanus toxoid ↘ specific lymphocyte proliferation	between 1.4 and 6.6 mg/kg 5.5 and 2.5 or 1.6 mg/kg 1.6 to 3.9 mg/kg or 2.9 and 5 mg/kg 2.5 mg/kg 3 mg/kg or 1.8 and 4.7 mg/kg 2.5, 1.8, and 4.7 mg/kg
Effects on organs and tissues	<i>non systematic effects</i> necrosis of pancreas, lymph nodes ↗ relative weight of liver ↗ relative weight of kidneys morphology of stomach (many studies)	0.5 mg/kg BW i.v. between 2.9 and 8.7 mg/kg between 2.9 and 3.9 mg/kg 0.6 to 19 mg/kg

If a rapid extensive distribution of DON in tissues and body fluids does occur in swine, the effect is very transient, and DON is rapidly and almost completely eliminated within 24 hours [79,83]. Half of the amount of the mycotoxin was eliminated within 5.8 hours in fattening pigs fed a diet naturally contaminated that contained 4.2 mg DON/kg [80]. Kidney was the only tissue that contained detectable amounts of the toxin 24 hours after the injection of 0.5 g DON/kg BW [35]. According to Prelusky and Trenholm

[83], only traces of DON were found in liver, kidneys and fat 24 hours after injection of 1 mg of the toxin /kg BW.

When pigs consume contaminated feed until slaughter, only traces of DON are measured: Côté *et al.* [21] detected DON inconsistently in stomach and colon contents, urine and plasma of piglets fed a diet containing 5.8 mg DON/kg, and only traces (< 50 ppb) were found in liver, kidneys, muscle, pancreas, stomach wall and lymph nodes. In pigs fed diets containing from 6 to 7.6 mg DON/kg during 3 to 7 weeks, only 13% of the tissues and organs sampled contained more than 10 ng toxin/g of wet tissue [84]. At lower doses (2.7 mg DON/kg feed), Pollmann *et al.* [24] also detected only traces of DON in liver, kidneys, spleen and heart of piglets. When a feed containing 2.2 mg DON was fed during 6 weeks to growing pigs, DON was not detected in liver, kidneys, heart, lungs or stomach if they were starved 12 to 15 h before slaughter [24].

## Conclusion

The particularities of DON metabolism in swine explain why this species is more susceptible to DON than other domestic animals: DON is rapidly and efficiently absorbed, extensively distributed in tissues and body fluids, and poorly metabolized. However, despite their large distribution, DON residues are eliminated quickly and only negligible amounts are detected in some organs and tissues 12 to 24 h after the last meal, i.e. in usual conditions of pig slaughter. The risks of contamination for humans through eating pork or other pig products are therefore almost nil. The main consequences of the ingestion of DON by pigs are then related to their poorer performance which is connected to reduce feed intake when feed contains more than 1 mg DON/kg (Table 1). In the case of high contamination levels, possible interactions of DON with immune function deserve to be studied in pigs during an infectious challenge.

## References

1. SCOOP 2003, 609 p, <http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf>
2. Pestka J.J., and Smolinski A.T. 2005, *J. Exp. Toxicol. Environ. Health, Part B*, 8, 39.
3. Mains E.B., Vestal C.M., and Curtis P.B. 1930, *Ind. Acad. Sci. Proc.*, 39, 101.
4. Vesonder R.F., Ciegler A., and Jensen A.H. 1978, *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 885.
5. Côté M.S., Reynolds J.D., Vesonder R.F., Buck W.B., Swanson S.P., Coffey R.T., and Brown D.C. 1984, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 184, 189.
6. Osweiler G.D., Stahr H.M., and Beran G.W. 1990, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2, 73.
7. Trenholm H.L., Cochrane W.P., Cohen H., Elliot J.I., Farnworth E.R., Friend D.W., Hamilton R.M.G., Standish J.F., and Thomson B.K. 1983, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66, 92.

8. Abramson D., Mills J.T., Marquardt R.R., and Frohlich A.A. 1997, *Can. J. Anim. Sci.*, 61, 49.
9. Moore C.J., Blaney B.J., Spencer R.A., and Dodman R.L. 1985, *Aust. Vet. J.*, 62, 60.
10. Vesonder R.F., and Hesseltine C.W. 1980/81, *Process Biochem.*, 16, 12.
11. Vesonder R.F., Ciegler A., and Jensen A.H. 1973, *Appl. Environ. Microbiol.*, 26, 1008.
12. Vesonder R.F., Ciegler A., Burmeister H.R., and Jensen A.H. 1979, *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 344.
13. Trenholm H.L., Hamilton R.M.G., Friend D.W., Thomson B.K., and Hartin K.E. 1984, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 185, 527.
14. Rotter B.A., Prelusky D.B., and Pestka J.J. 1996, *J. Toxicol. Environ. Health*, 48, 1.
15. Eriksen G.S., and Pettersson H. 2004, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 114, 205.
16. Young L.G., McGirr L., Valli V.E., Lumsden J.H., and Lun A. 1983, *J. Anim. Sci.*, 57, 655.
17. Friend D.W., Trenholm H.L., Elliot J.I., Thomson B.K., and Hartin K.E. 1982, *Can. J. Anim. Sci.*, 62, 1211.
18. Bergsjø B., Langseth W., Nafstad I., Høgset Jansen J., and Larsen H.J.S. 1993, *Vet. Res. Commun.*, 17, 283.
19. Friend D.W., Trenholm H.L., Thomson B.K., Fiser P.S., and Hartin K.E. 1986, *Can. J. Anim. Sci.*, 66, 765.
20. Friend D.W., Trenholm H.L., Thomson B.K., Prelusky D.B., and Hartin K.E. 1986, *Can. J. Anim. Sci.*, 66, 1075.
21. Côté L.M., Beasley V.R., Bratich P.M., Swanson S.P., Shivaprasad H.L., and Buck W.B. 1985, *J. Anim. Sci.*, 61, 942.
22. Lun A.K., Young L.G., and Lumsden J.H. 1985, *J. Anim. Sci.*, 61, 1178.
23. Grosjean F., Taranu I., Skiba F., Callu P., and Oswald I. 2002, *Journées Rech. Porcine*, 34, 333.
24. Pollmann D.S., Koch D.A., Seitz L.M., Mohr H.E., and Kennedy G.A. 1985, *J. Anim. Sci.*, 60, 239.
25. Foster B.C., Trenholm H.L., Friend D.W., Thomson B.K., and Hartin K.E. 1986, *Can. J. Anim. Sci.*, 66, 1149.
26. Forsyth D.M., Yoshizawa T., Morooka N., and Tuite J. 1977, *Appl. Environ. Microbiol.*, 34, 547.
27. Chavez E.R., and Rheaume J.A. 1986. *Can. J. Anim. Sci.*, 66, 277.
28. Bergsjø B., Matre T., and Nafstad I. 1992, *J. Vet. Med. Assoc.*, 39, 752.
29. Rotter B.A., Thomson B.K., and Lessard M. 1995, *Can. J. Anim. Sci.*, 75, 297.
30. Grosjean F., Callu P., Pinton P., Skiba F., Barrier-Guillot B., and Oswald I. 2003, *Journées Rech. Porcine*, 35, 443.
31. Pestka J.J., Lin W.S., and Miller E.R. 1987, *Food Chem. Toxicol.*, 25, 855.
32. Müller G., Kielstein P., Rosner H., Berndt A., Heller M., and Köhler H. 1999, *Mycoses*, 42, 485.
33. Prelusky D.B., and Trenholm H.L. 1993, *Nat. Toxins*, 1, 296.
34. Prelusky D.B., Yeung J.M., Thomson B.K., and Trenholm H.L. 1992, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 22, 36.
35. Coppock R.W., Swanson S.P., Gelberg H.B., Koritz G.D., Hoffman W.E., Buck W.B., and Vesonder R.F. 1985, *Am. J. Vet. Res.*, 46, 169.

36. Prelusky D.B., Hartin K.E., and Trenholm H.L. 1990, *J. Environ. Sci. Health*, B25, 395.
37. Prelusky D.B. 1996, *J. Environ. Sci. Health*, B31, 1103.
38. Prelusky D.B. 1993, *J. Environ. Sci. Health*, B28, 731.
39. Swamy H.V.L.N., Smith T.K., and MacDonald E.J. 2004, *J. Anim. Sci.*, 82, 2131.
40. Smith T.K. 1992, *J. Anim. Sci.*, 70, 3989.
41. Prelusky D.B. 1994, *J. Environ. Sci. Health*, B29, 1203.
42. EFSA. 2004, *EFSA J.*, 73, 1.
43. Rotter B.A., Thomson B.K., Lessard M., Trenholm H.L., and Tryphonas H. 1994, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 23, 117.
44. Dersjant-Li Y., Verstegen M.W.A., and Gerrits W.J.J. 2003, *Nutr. Res. Rev.*, 16, 223.
45. He, Young L.G., and Forsberg C. 1993, *J. Anim. Sci.*, 71, 963.
46. Goyarts T., Danicke S., Rothkotter H.J., Spilke J., Tiemann U., and Schollenberger M. 2005, *J. Vet. Med.*, A 52, 305.
47. Prelusky D.B. 1997, *Nat. Toxins*, 5, 121.
48. Trenholm H.L., Foster B.C., Charmley L.L., Thomson B.K., Hartin K.E., Coppock R.W., and Albassam M.A. 1994, *Can. J. Anim. Sci.*, 74, 361.
49. Prelusky D.B., Gerdes R.G., Underhill K.L., Rotter B.A., Jui P.Y., and Trenholm H.L. 1994, *Nat. Toxins*, 2, 97.
50. Chavez E.R. 1984. *Can. J. Anim. Sci.*, 64, 717.
51. Øvernes G., Matre T., Sivertsen T., Larsen H.J.S., Langseth W., Reitan L.J., and Jansen J.H. 1997, *J. Vet. Med.*, A44, 539.
52. Dänicke S., Valenta H., Klobasa F., Doll S., Ganter M., and Flachowsky G. 2004, *Arch. Anim. Nutr.*, 58, 1.
53. Dänicke S., Goyarts T., Döll S., Grove N., Spolders M., and Flachowsky G. 2006, *Toxicol. Letters*, 165, 297.
54. Friend D.W., Trenholm H.L., Fiser P.S., Thomson B.K., and Hartin K.E. 1983, *Can. J. Anim. Sci.*, 63, 689.
55. Diaz-llano G., and Smith T.K. 2006, *J. Anim. Sci.*, 84, 2361.
56. Friend D.W., Thomson B.K., Trenholm H.L., Hartin K.E., and Prelusky D.B. 1986, *Can. J. Anim. Sci.*, 66, 229.
57. Etienne M., Oswald I.P., Bony S., Lallès J.P., Pinton P., Trépiér B., and Lessard M. 2006, *Journées Rech. Porcine*, 38, 233.
58. Harvey R.B., Kubena L.F., Huff W.E., Corrier D.E., Clark D.E., and Phillips T.D. 1989, *Am. J. Vet. Res.*, 50, 602.
59. Harvey R.B., Edrington T.S., Kubena L.F., Elissalde M.H., Casper H.H., Rottinghaus G.E., and Turk J.R. 1996, *Am. J. Vet. Res.*, 57, 1790.
60. Accensi F., Pinton P., Callu P., Abella-Bourges N., Guelfi J.-F., Grosjean F., and Oswald I.P. 2006, *J. Anim. Sci.*, 84, 1935.
61. Swamy H.V.L.N., Smith T.K., MacDonald E.J., Boermans H.J., and Squires E.J. 2002, *J. Anim. Sci.*, 80, 3257.
62. Pestka J.J., Zhou H.R., Moon Y., and Chung Y.J. 2004, *Toxicol. Lett.*, 153, 61.
63. Oswald I.P. 2006, *Vet. Res.*, 37, 359.
64. Pinton P., Bracarense A.P., Taranu I., Marin D, Ferrier L., and Oswald I.P. 2007, *12<sup>th</sup> International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, May 21-25, Istanbul. Turkey.



65. Takayama H., Shimada N., Mikami O., and Murata H. 2005, *J. Vet. Med. Sci.*, 67, 531.
66. Waché Y.G., Haddioui L., Belkhelfa H., Mori Y., Riveron E., Roques C. and Oswald I.P. 2007, *12<sup>th</sup> International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, May 21-25, Istanbul. Turkey.
67. Oswald I. 2007, *Journées Rech. Porcine*, 39, 419.
68. Grosjean F. Pinton P., Callu P., Oswald I. 2007, *Journées Rech. Porcine*, 39, 427.
69. Pinton P., Accensi F., Beauchamp E., Cossalter A.-M., Callu P., Grosjean F., and Oswald I.P. 2006, *Journées Rech. Porcine*, 38, 399.
70. Goyarts T., Dänicke S., Tiemann U. and Rothkotter H.J. 2006, *Toxicol. In Vitro*. 20, 858.
71. Drochner W., Schollenberger M., Piepho H.-P., Götz S., Lauber U., Tafaj M., Klobasa F., Weiler U., Claus R., and Steffl M. 2004, *J. Toxicol. Environ. Health*, 67, 1051.
72. Pinton P., Royer E., Accensi F., Marin D., Fi J.-F., Bourges-Abella N., Granier R., Grosjean F., and Oswald I. 2004, *Journées Rech. Porcine*, 36, 301.
73. Li M., Cuff C.F., and Pestka J. 2005, *Toxicol Sci.* 2005. 87,134.
74. Li M., Harkema J.R., Cuff C.F., and Pestka J.J. 2007, *Toxicol Sci.* 95,412.
75. Tiemann U, Brussow K.P., Jonas L, Pohland R, Schneider F, Danicke S. 2006, *J. Anim. Sci.*, 84, 236.
76. Tiemann U., Brüsov K.-P., Küchenmeister U., Jonas L., Kohlschein P., Pöhland R., and Dänicke S. 2006, *Food Chem. Toxicol.*, 44, 1228.
77. Friend D.W., Trenholm H.L., Young J.C., Thomson B.K., and Hartin K.E. 1984, *Can. J. Anim. Sci.*, 64, 733.
78. Rotter B.A., Thomson B.K., Trenholm H.L., Prelusky D.B., Hartin K.E., and Miller J.D. 1992, *Can. J. Anim. Sci.*, 72, 107.
79. Prelusky D.B., Hartin K.E., Trenholm H.L., and Miller H.D. 1988, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 10, 276.
80. Dänicke S., Valenta H., and Doll S. 2004a, *Arch. Anim. Nutr.*, 58, 169.
81. Doll S., Danicke S., Ueberschar K.H., Valenta H., Schnurrbusch U., Ganter M., Klobasa F., and Flachowsky G. 2003, *Arch. Tierernähr.*, 57, 311.
82. Côté L.M., Buck W., and Jeffery E. 1987, *Food Chem. Toxicol.*, 25, 291.
83. Prelusky D.B., and Trenholm H.L. 1991, *J. Agric. Food Chem.*, 39, 748.
84. Prelusky D.B., and Trenholm H.L. 1992, *J. Food Sci.*, 57, 801.

# **TRAVAIL EXPÉRIMENTAL**

## **OBJECTIF DE LA THÈSE :**

Pour les animaux de rente tels que les porcs, la part importante de céréales dans leur alimentation fait que ces animaux sont particulièrement exposés aux mycotoxines. La réduction de la formation de moisissures avant et/ou après les récoltes par de bonnes pratiques agricoles est certes le meilleur moyen de prévenir le risque de production de mycotoxines, mais récolter et stocker les grains dans des conditions favorables n'est pas toujours possible, et la mise en place de mesures de prévention peut parfois se révéler insuffisante. De plus, beaucoup de mycotoxines sont des composés très stables durant le stockage mais également au cours des traitements technologiques de préparation des aliments. Les mycotoxines restent donc présentes dans l'aliment « fini », même après la disparition des moisissures (CAST, 2003). L'utilisation de céréales contaminées par des fusariotoxines tel que le DON constitue donc un véritable risque pour la santé animale (Fink-Gremmels, 1999).

L'Aflatoxine B1 est actuellement la seule mycotoxine réglementée pour l'alimentation animale dans l'Union Européenne (Tableau 1). La commission européenne a émis récemment des recommandations sur les teneurs maximales d'autres mycotoxines dont le DON dans les aliments pour animaux, sans que celles-ci ne soient imposées. Parmi les problèmes liés à l'établissement des réglementations, l'absence de données toxicologiques est régulièrement avancée et il semble par conséquent indispensable de pouvoir caractériser et comprendre les mécanismes d'action de ces toxines, afin d'anticiper leurs effets chez les animaux.

Parmi les espèces domestiques, le porc est reconnu comme l'espèce la plus sensible au DON. La toxicité aiguë de cette mycotoxine lui a valu le nom de « vomitoxine », en raison des refus alimentaires et vomissements observés chez les porcs après l'ingestion de concentrations élevées de DON (Vesonder *et al.*, 1973). Cet effet spectaculaire reste néanmoins exceptionnel mais l'absorption prolongée d'aliments contenant des doses faibles ou moyennes de DON entraîne tout de même des baisses de performances voire un affaiblissement physiologique général des animaux (Rotter *et al.*, 1996). Cette toxicité chronique se manifeste majoritairement par une diminution de la consommation alimentaire, du gain de poids, de la reproduction et affecte le système immunitaire des porcs au niveau systémique (Etienne et Wache, 2008). Cependant, peu d'informations sont encore disponibles sur les effets d'une ingestion chronique de faibles concentrations de DON, en particulier sur la réponse immunitaire cellulaire, sur la flore bactérienne intestinale, sur la sensibilité des

animaux aux infections et sur une excrétion potentielle d'agents zoonotiques lors d'un portage asymptomatique.

Comme cela a été mis en évidence pour d'autres mycotoxines, les effets du DON sur le système immunitaire peuvent apparaître à des concentrations inférieures au seuil de toxicité aiguë (Oswald et Comera, 1998). De plus, il a été démontré chez différentes espèces animales, que le DON a la particularité d'avoir des effets stimulateurs ou inhibiteurs sur certaines composantes du système immunitaire selon la dose et la durée d'exposition à la toxine (Pestka, 2008). Chez le porc, cette toxine augmente la concentration sérique en IgA et stimule la prolifération des lymphocytes T après stimulation *in vitro* par un agent mitogène (Pinton *et al.*, 2004). Cependant, très peu de travaux ont été réalisés afin de comparer et de comprendre les mécanismes d'action du DON sur les cellules principales du système immunitaire inné du porc, notamment les neutrophiles et les macrophages.

Les mycotoxines ont déjà été incriminées comme agents aggravants de l'excrétion de salmonelles, mais jusqu'ici, aucune démonstration scientifique n'a réellement permis d'accréditer cette hypothèse. Cependant, des études effectuées à l'INRA de Toulouse ont montré que l'ingestion d'une autre fusariotoxine, la fumonisine B1, augmentait la sensibilité des porcelets à l'infection colibacillaire et altérait la fonction de barrière de l'épithélium intestinal en diminuant la réponse immunitaire locale (Oswald *et al.*, 2003; Bouhet *et al.*, 2006). Dans l'hypothèse d'une action sur le développement bactérien, le DON pourrait influencer sur l'équilibre de la flore intestinale des porcs et ainsi entraîner une augmentation de la prévalence des troubles digestifs. Sachant qu'une microflore intestinale perturbée favorise la prolifération de pathogènes dans le tube digestif, l'ingestion d'aliments contaminés en DON pourrait entraîner ainsi une sensibilisation accrue des animaux à des agents pathogènes, telles que les salmonelles.

Dans les pays industrialisés, *Salmonella enterica* est l'un des principaux agents pathogènes de contamination des élevages de porcs, et se manifeste majoritairement par un portage asymptomatique de la bactérie (Boyen *et al.*, 2008). Un déséquilibre de la flore digestive des porcs reste à priori un des principaux facteurs de risque pour la prolifération digestive et l'excrétion des salmonelles. Par ailleurs, les opérateurs de la filière porcine observent chez les animaux une augmentation inquiétante de troubles digestifs chroniques liés à des déséquilibres de leur flore intestinale, mais aussi aux restrictions apportées à l'utilisation d'antibiotiques ou de facteurs de croissance qui étaient utilisés, entre autre, comme régulateurs de la flore intestinale.

**Dans ce contexte, l'objectif général de la thèse est de déterminer et de comprendre les effets et les mécanismes d'action du DON, par une démarche associant l'étude *in vitro* des effets toxiques du DON sur différents types de cellules phagocytaires de la réponse immunitaire, et une approche *in vivo* des effets chroniques de la toxine sur la flore microbienne intestinale et la sensibilité à un agent pathogène.**

La première partie de notre travail a été **d'analyser *in vitro* les effets du DON sur les cellules phagocytaires de la réponse immunitaire du porc, après stimulation par un agent pathogène.** Cette étude a été réalisée au sein de l'unité de Pharmacologie de l'INRA de Toulouse, en collaboration avec des équipes de recherches extérieures. Dans une approche expérimentale, nous avons tout d'abord étudié les effets du DON sur l'expression de certains récepteurs membranaires des macrophages, récepteurs impliqués dans l'activation et la coopération cellulaire de la réponse immunitaire non spécifique. Grâce à une technique d'isolement mise au point au laboratoire, nous avons ensuite étudié les effets du DON sur les principales fonctions des neutrophiles porcins stimulés *in vitro* par un composé mimant la présence d'un agent pathogène, le LPS. Pour cette étude originale, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au chimiotactisme des cellules, à leur capacité de phagocytose et à l'expression de certaines cytokines. Après une évaluation des doses non cytotoxiques de DON, les résultats obtenus nous ont ainsi permis de caractériser le mode d'action du DON sur des fonctions encore non explorées de ces cellules phagocytaires, en particulier des neutrophiles.

Dans le deuxième volet de cette thèse, l'étude *in vivo* a été réalisée sur le site de l'AFSSA de Ploufragan. Elle a eu pour objectif **d'évaluer l'impact du DON sur la flore microbienne intestinale et sur la sensibilité des porcs à un portage asymptomatique de *Salmonella enterica* Typhimurium.** Nous avons tout d'abord étudié les effets chroniques d'une alimentation contaminée en DON sur l'équilibre de la flore intestinale des porcs, en utilisant un outil de biologie moléculaire nous permettant d'évaluer la flore bactérienne dans sa totalité (bactéries cultivables et bactéries non cultivables). Une évaluation de la sensibilité des animaux infectés artificiellement par des salmonelles à partir d'un modèle de portage asymptomatique validé au laboratoire de l'AFSSA – Ploufragan, a également été réalisée. En parallèle et tout au long de ces études, une attention particulière a été apportée aux paramètres zootechniques, sanitaires et immunitaires des animaux.

**CHAPITRE I :**

**EFFETS DU DON SUR LES CELLULES PHAGOCYTAIRES DU SYSTEME  
IMMUNITAIRE NON SPECIFIQUE : ÉTUDE *IN VITRO*.**

## CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Depuis plus d'une vingtaine d'années, le DON est connu pour avoir des effets immunotoxiques envers les cellules du système immunitaire. Cette propriété du DON est expliquée en partie par sa capacité à inhiber la synthèse des protéines, mais également par son action modulatrice sur l'expression de médiateurs de l'inflammation et, par voie de conséquence, sur la signalisation cellulaire. La caractérisation des effets du DON sur les leucocytes ainsi que l'étude de ces mécanismes intracellulaires reste donc un point essentiel de la lutte contre les toxicoses engendrées par cette toxine (Pestka, 2008).

Les leucocytes sont extrêmement sensibles au DON. Chez diverses espèces, les effets de cette toxine ont été démontrés sur les fonctions de ces cellules telles que la capacité des lymphocytes T et B à proliférer en réponse à un agent mitogène, les propriétés de phagocytose des macrophages et des monocytes circulant, l'activité anti-tumorale des cellules Natural Killer et la libération de certains médiateurs protéiques de l'inflammation comme les cytokines. De plus, le DON agit sur les cellules phagocytaires en amplifiant les effets de certains agents pathogènes comme le LPS, de façon synergique, aggravant ainsi les éventuelles lésions tissulaires causées par la réaction inflammatoire (Pestka et Smolinski, 2005).

Depuis quelques années, des études *in vitro* et *in vivo* sur le mode d'action de cette toxine au niveau moléculaire se sont multipliées, en particulier sur les cellules phagocytaires mononuclées. Les résultats font apparaître clairement que le DON module l'expression de certains gènes impliqués dans la coopération cellulaire et l'activation d'une réponse coordonnée des cellules immunitaires par l'activation de divers mécanismes, tels que les protéines de la voie de signalisation des MPAKs, les facteurs de transcription nucléaire NF- $\kappa$ B, ainsi que la stabilisation des ARN messagers. Ces mécanismes ont cependant été essentiellement démontrés pour l'Homme et la souris et très peu d'informations sont disponibles pour le porc.

Chez le porc, la description des effets du DON sur les cellules de l'immunité reste à ce jour très limitée. Les données de la littérature concernent essentiellement la capacité des lymphocytes à proliférer en réponse à un agent mitogène, les mesures *in vivo* ne démontrant en général pas d'effets du DON suivant l'étude considérée (Rotter *et al.*, 1994; Harvey *et al.*, 1996; Grosjean *et al.*, 2003; Pinton *et al.*, 2004), alors que des études *in vitro* ont montré une diminution de 50 % de la prolifération des lymphocytes sanguins exposés à 0,1  $\mu$ M (0,03

µg/ml) de DON après stimulation mitogénique à la concavaline A (Goyarts *et al.*, 2006b; Tiemann *et al.*, 2006). En ce qui concerne les cellules de l'inflammation, les quelques observations *in vivo* ne montrent pas d'effet notable du DON sur le nombre de neutrophiles et de monocytes circulant chez le porc (Rotter *et al.*, 1994; Accensi *et al.*, 2006). A notre connaissance, une seule étude *in vitro* a montré un effet du DON sur les fonctions des neutrophiles, où les auteurs ont observé une diminution de la production de dérivés oxygénés après une exposition à 1 et 10 µM (0,3 et 3 µg/ml) de DON (Takayama *et al.*, 2005).

Les macrophages jouent également un rôle central dans la défense immunitaire de l'hôte. Lors de leur activation, ces cellules surexpriment différents récepteurs au niveau de leur membrane, considérés comme marqueurs de différenciation cellulaire. Ces récepteurs sont impliqués dans les différentes fonctions des macrophages (migration, adhésion, signalisation cellulaire,...). Chez les rongeurs, de nombreuses études ont montré que le DON affecte les macrophages, mais peu d'études sont disponibles concernant les effets du DON sur les macrophages humains, notamment sur l'expression des récepteurs de surface. Par ailleurs, un récent travail *in vitro*, mené sur un autre type cellulaire impliqué dans la réponse immunitaire non spécifique, a montré que le DON pouvait perturber les fonctions et l'expression de récepteurs de surface des cellules dendritiques de porc (Bimczok *et al.*, 2007).

Le DON est absorbé au niveau de l'intestin des porcs et se retrouve rapidement dans le plasma sanguin et les tissus des animaux lors d'une ingestion chronique d'aliment contaminé (Goyarts et Danicke, 2006), pouvant ainsi être en contact direct avec les cellules précitées. En absence de données bibliographiques chez le porc, il nous semblait primordial de pouvoir caractériser les effets du DON sur ces types cellulaires. Ainsi, l'objectif de cette première partie du travail expérimental a été d'étudier *in vitro* les effets de faibles doses de DON sur deux populations de cellules phagocytaires, les macrophages et les neutrophiles.



## **1. Effets du DON sur l'expression des marqueurs de surface des macrophages humains :**

Dans la première partie de cette étude *in vitro*, nous nous sommes tout d'abord intéressés aux effets du DON sur l'expression de récepteurs membranaires des macrophages. En effet, quelques études ont montré que le DON affecte les fonctions des macrophages humains, mais son effet sur l'expression des récepteurs de surfaces impliqués dans l'adhésion et la signalisation cellulaire n'a jamais été étudié. En l'absence d'anticorps disponible pour le porc, cette première étude a été réalisée sur des macrophages humains. Cependant, l'homme et le porc montrant un haut degré de similitude pour le système immunitaire, nos résultats nous permettront de caractériser le mode d'action du DON sur des fonctions encore non explorées des macrophages, et de transposer ultérieurement notre méthode sur des macrophages porcins.

Des monocytes sanguins humains provenant de donneurs sains ont été isolés puis différenciés *in vitro* en macrophages, après quatre jours d'incubation. Afin de tester l'effet du DON sur ces macrophages, les cellules ont été exposées à différentes doses non-cytotoxiques de DON (0 à 5  $\mu\text{M}$ , soit 0,15  $\mu\text{g/ml}$ ), avant ou après stimulation avec de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Ensuite, l'expression de 9 récepteurs de surface (ou Clusters of differentiation, CD), considérés comme des marqueurs de différenciation des macrophages (CD11c, CD13, CD14, CD18, CD33, CD35, CD54, CD119 et HLA- DP/DQ/DR) a été analysée par cytométrie de flux. L'activation des macrophages avec de l'IFN- $\gamma$  a montré une augmentation de l'expression de CD54, CD14, CD119 et HLA-DP/DQ/DR. En fonction de la dose, le DON a diminué l'expression de ces récepteurs lors de leur activation par l'IFN- $\gamma$  et cet effet inhibiteur n'a été observé que lors d'une pré-exposition des macrophages à la toxine. Après une exposition des macrophages avec 5  $\mu\text{M}$  (0,15  $\mu\text{g/ml}$ ) de DON, l'IFN- $\gamma$  n'a eu aucun effet sur l'expression des récepteurs précités, inhibant ainsi totalement l'activation de ces phagocytes. Nos résultats suggèrent que l'exposition des macrophages à des doses de DON susceptible d'être retrouvées chez l'homme (Meky *et al.*, 2003; Pestka et Smolinski, 2005) diminue l'activation des macrophages par l'IFN- $\gamma$ , en altérant l'expression de certain marqueur de surface. Des études complémentaires sur les mécanismes d'action impliqués et l'exploration de cet effet de la toxine sur des macrophages porcins seront à envisager.

**Ce travail est présenté ici sous forme d'article scientifique, et a été soumis en avril 2009 au journal «*Toxicology*».**

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

The mycotoxin Deoxynivalenol inhibits the cell surface expression of activation markers in  
human macrophages

Yann J. Waché<sup>a</sup>, Laila Hbabi-Haddioui<sup>b</sup>, Laurence Guzylack-Piriou<sup>a</sup>, Haouaria Belkhef<sup>b</sup>,  
Christine Roques<sup>b</sup> and Isabelle P. Oswald<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> INRA–Unité de Pharmacologie - Toxicologie, 180 chemin de Tournefeuille, BP93173, 31931  
Toulouse cedex 9 - FRANCE

<sup>b</sup> Fonderephar-Laboratoire de microbiologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques - 35 chemin des  
Maraîchers, 31062 TOULOUSE cedex 9 – France

- Corresponding author at : INRA, Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie UR66, 180 chemin  
de Tournefeuille BP3, 31027 Toulouse cedex 3, France. Tel: +33 5 61 28 54 80. Fax: +33 5 61 28  
53 10. E-mail address: [isabelle.oswald@toulouse.inra.fr](mailto:isabelle.oswald@toulouse.inra.fr)

- **Keywords:** Fusarium mycotoxin, Deoxynivalenol, Human, Immune Response, Macrophages,  
Flow Cytometry, Cluster of Differentiation, ICAM-1, CD14, IFN- $\gamma$  receptor, MHC class II

## Abstract

1  
2  
3  
4  
5 Deoxynivalenol (DON) is the most prevalent trichothecene mycotoxin in crops in Europe and North  
6  
7 America. It exhibits several toxic effects including impaired growth and immune dysregulation.  
8  
9 Macrophages play pivotal role in the host defense; upon activation, they express several specific cell  
10  
11 surface receptors that are important in adhesion and cell signaling. Several studies have demonstrated  
12  
13 that DON can affect macrophages, however, very few data are available concerning the effect of DON  
14  
15 on human macrophages, and the effect on macrophage cell surface receptors is unknown. In the  
16  
17 present study, human blood monocytes, differentiated *in vitro* into macrophages, were activated with  
18  
19 IFN- $\gamma$ , in the presence or absence of low concentrations of DON. The expression of CD11c, CD13,  
20  
21 CD14, CD18, CD33, CD35, CD54, CD119 and HLA- DP/DQ/DR was analyzed by flow cytometry.  
22  
23 As expected, macrophage activation by IFN- $\gamma$  up-regulated the expression of CD54, CD14, CD119  
24  
25 and HLA-DP/DQ/DR. Incubation with DON decrease the cell surface expression of these activation  
26  
27 markers in a dose-dependent manner. When cells were treated with 5 $\mu$ M DON, the mean fluorescence  
28  
29 intensity measured for the expression of these receptors was at the same as the one observed in non-  
30  
31 activated macrophages. This inhibitory effect of DON was only observed when the mycotoxin was  
32  
33 applied before the activation signal. Taken together, our results suggest that low concentration of DON  
34  
35 alter macrophage activation as measured by the expression of cell surface markers. This may have  
36  
37 implications for human health when consuming DON contaminated feed.  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 1. Introduction

1  
2 Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi that may contaminate all  
3  
4 stages of the food chain. The toxicological syndromes caused by ingestion of such toxins  
5  
6 range from acute mortality to slow growth and reduced reproductive efficiency (CAST,  
7  
8 2003). Consumption of fungal toxins may also result in impaired immunity and decreased  
9  
10 resistance to infectious diseases (Oswald and Comera, 1998; Oswald et al., 2005). The global  
11  
12 occurrence of mycotoxins is considered an important risk factor for both human and animal  
13  
14 health (Bryden, 2007).  
15  
16  
17  
18

19 Deoxynivalenol (DON), also known as “vomitoxin”, is a mycotoxin classified as a  
20  
21 type B trichothecene which is produced mainly by *Fusarium graminearum* and *F. culmorum*.  
22  
23 DON occurs in toxicologically relevant concentrations in cereals and grains worldwide.  
24  
25 Recent surveys including 11,022 cereals samples from 12 European countries, indicated that  
26  
27 57 % of the samples were positive for DON contamination (SCOOP, 2003). Furthermore, this  
28  
29 toxin is resistant to milling, processing and heating, and, therefore, readily enters in human  
30  
31 and animal food chain (Jackson and Bullerman, 1999; Rotter et al., 1996). Human exposure to  
32  
33 DON has also been demonstrated using a glucuronide metabolite as a urinary biomarker  
34  
35 (Turner et al., 2008). DON exhibits toxic effects in humans as well as in all animal species  
36  
37 investigated so far. This toxin impairs growth in experimental animals and induces immune  
38  
39 dysregulation (Accensi et al., 2006; Pestka and Smolinski, 2005; Pinton et al., 2008).  
40  
41 Depending on dose and frequency of exposure, DON can be either immunosuppressive or  
42  
43 immunostimulatory. At the cellular level DON interacts with the peptidyltransferase at the  
44  
45 60S ribosomal subunit level, triggering a “ribotoxic stress” (Pestka, 2008).  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52

53 Macrophages play pivotal role in the host defense. As a component of the innate  
54  
55 immune response, they form the first line of defense. They also act as important accessory  
56  
57 cells in the adaptative immune response (Ma et al., 2003). Upon activation, macrophages  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

produce different inflammatory cytokines and express several specific cell surface receptors, or cluster of differentiation (CD), which have an important role in cell signaling and adhesion (Schroder et al., 2004).

Several *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that DON can affect macrophages (review in (Pestka and Smolinski, 2005). Macrophage exposure to low doses of DON increases the secretion/production of several inflammatory cytokines (Döll et al., 2009; Ji et al., 1998; Wong et al., 1998). By contrast, exposure to high doses of DON induces macrophage apoptosis (Zhou et al., 2005). Most of the data have been obtained on the RAW 264.7 macrophage cell lines (Chung et al., 2003; Moon and Pestka, 2002; Wong et al., 2001) and on mouse macrophages (Jia et al., 2006; Pestka and Zhou, 2006; Yan et al., 1998). Very few data are available concerning the effect of DON on primary human macrophages (Parent-Massin et al., 1994; Sugita-Konishi and Pestka, 2001) and to the best of our knowledge the effect of DON on the expression of macrophage cell surface receptors has never been investigated.

Consequently, using human monocyte-derived macrophages, the aim of the present study was to analyze the effect of DON on the expression of cell surface receptor with particular emphasis on macrophage activation markers.

## 2. Materials and methods

### Reagents

RPMI 1640 medium, penicillin, streptomycin, L-glutamine, Trypan blue, formaldehyde, Phosphate Buffer Salt (PBS), Fetal Bovine Serum (FBS), recombinant human Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), and DON were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Lymphocyte Separation Medium (density 1.077) was obtained from Eurobio (Les Ulis, France). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated monoclonal mouse Ab (mAb) anti-human CD11c (clone KB90), CD13 (clone WM-47), CD14 (clone TÜK4), CD33 (clone WM-54), CD35 (clone Ber-MAC-DRC), CD54 (clone 6.5B5), HLA-DP/DQ/DR (clone CR3/43), CD119 (clone GR-20) and control mouse IgGs (IgG1 and IgG2a) were purchased from Dako (Glostrup, Denmark). The FITC monoclonal mAb anti-human CD18 (clone YFC118.3) was obtained from AbD Serotec (Düsseldorf, Germany).

### Isolation and differentiation of human peripheral monocytes

Human mononuclear cells were isolated from fresh buffy coats obtained from anonymous healthy donors (Etablissement Français du Sang, Toulouse, France). Briefly, buffy coats were diluted with PBS solution (1:1), layered over Lymphocyte Separation Medium and centrifuged (30 min, 300 g, room temperature). The mononuclear rich-cell ring was recovered and washed twice in serum-free RPMI 1640. Mononuclear cells were then re-suspended in complete RPMI 1640, *i.e.* RPMI supplemented with 10% FBS, 2mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 50  $\mu$ g /mL streptomycin. Cells were seeded in 6-well plate at a concentration of  $12 \times 10^6$  cells/well in 2 mL of media and incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After 2 hours, the supernatants containing non-adherent cells was discarded and adherent monocytes were washed gently with PBS, and further cultured in 5 mL of complete RPMI 1640 containing 20% FBS, for 4 additional days to obtained adherent

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

monocyte-derived macrophages (MDMs). The viability of adherent cells was over 95% as assessed by trypan blue exclusion and the proportion of MDMs as determined by microscopical observation was greater than 90%.

#### Treatment of monocyte-derived macrophage and flow cytometry analysis of cell surface expression markers

Human monocyte-derived macrophages, obtained as already described, were resuspended at  $2 \times 10^6$  cells/mL in complete RPMI, distributed in 6 well plates (2mL/well) and incubated for 18 hours with various concentration of DON (0 to 5  $\mu$ M). MDMs were then treated for additional 18 hours with 100 ng/mL recombinant human IFN- $\gamma$ . An alternative protocol was also used where MDMs were first treated with IFN- $\gamma$  and then activated with DON.

Expression of different cell surface molecules on MDMs was then analyzed by flow cytometry. Cells were scraped, resuspended in PBS supplemented with 1.5% FBS and aliquoted into tubes ( $1 \times 10^5$  cells/tube in 100  $\mu$ L). Cells were incubated, for 30 minutes at 4°C, with 10  $\mu$ L of FITC-conjugated anti-CD14, -CD11c, -CD13, -CD18, -CD33, -CD35, -CD54, -CD119 or -HLA mouse monoclonal antibody (mAb). Isotype-matched mouse IgG2a was used as a negative control for CD14 and IgG1 for all other antibodies tested. After washing, cells were fixed in 1% paraformaldehyde and analyzed on a Cyan™ ADP flow cytometer (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Each measurement was conducted on 10,000 events, analyzed on the Summit 4.3 DakoCyan™ software and expressed as the Mean Fluorescence Intensity (MFI).

## Statistical analyses

All data are shown as mean  $\pm$  Standard Error of the Mean (SEM) of data obtained from 3 to 8 different donors. Paired student's *t* tests were used to analyze the differences in expression of cell surface activation markers. *P* values  $< 0.05$  were considered significant.

### **3. Results**

#### Effect of DON on the expression of CD54 on macrophages

We first investigated the effect of DON on the expression of CD54, also called ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1), an essential adhesion molecule of antigen presenting cells for interaction with T-cells. As shown on Figure 1A, inactivated cells expressed this surface marker (MFI = 15.9) and IFN- $\gamma$  activation greatly increased its expression (MFI = 35.8). When IFN- $\gamma$  was added on 0.1  $\mu$ M DON-treated macrophage culture, the surface expression of CD54 was like DON-free cultures (MFI = 36.3), at 1  $\mu$ M DON the expression of this surface marker decreased by 28 % (MFI = 25.7) and at 5  $\mu$ M, the IFN- $\gamma$ -induced upregulation of CD54 was completely prevented (MFI = 16.9).

This suppressive effect of DON on the upregulation of ICAM-1 by IFN- $\gamma$  was confirmed on MDMs obtained from 6 different healthy donors (Figure 1B). A statistically significant lower expression was observed with macrophages pretreated with DON concentration of 0.5  $\mu$ M and higher.

We then determined if the reduction of the CD54 expression on MDMs was also observed if the DON treatment was applied after the activation signal. MDMs obtained from three healthy donors were treated sequentially with (i) DON and then IFN- $\gamma$  or (ii) IFN- $\gamma$  and then DON and the expression of CD54 was measured by flow cytometry. As indicated in Table 1, the inhibitory effect of DON was only observed when the mycotoxin was applied



1 before the activation signal. When MDMs were first activated for 18 hours with IFN- $\gamma$ , DON  
2 only exerted a minimal and not significant inhibitory effect, independent of the concentration  
3 used (0.1 to 5  $\mu$ M).  
4  
5  
6  
7  
8

#### 9 Effect of DON on the surface expression of several activation marker

10  
11 In order to determine the specificity of the inhibitory action of DON, the expression of  
12 several other surface molecules, implicated in different cell signaling responses mechanisms  
13 was determined. We especially studied the effect of mycotoxin treatment on the expression of  
14 CD11c, CD13, CD14, CD18, CD33, CD35, CD119, and HLA-DP/DQ/DR on human  
15 monocyte-derived macrophages.  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

24 All these different surface receptors were expressed on resting macrophages, but the  
25 expression of CD14, CD119 and HLA-DP/DQ/DR was increased 1.5 to 4.4 fold after IFN- $\gamma$   
26 activation (Figure 2). As observed for CD54, the IFN- $\gamma$ -induced upregulation of CD14,  
27 CD119 and HLA-DP/DQ/DR was inhibited in a dose-dependent manner by the treatment with  
28 DON. When cells were treated with 5 $\mu$ M DON, the MFI measured for these receptors was at  
29 the same level as the one observed in non-activated macrophages (Figure 2).  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38

39 The expression of CD11c was not significantly increased in activated macrophages  
40 when compared to control cells and the DON treatment did not induce any changes (Figure  
41 2). Similarly, IFN- $\gamma$  and DON treatment did not induce any modification in the expression of  
42 CD13, CD18, CD33 and CD35 (data not shown).  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

#### 51 **4. Discussion**

52 The capacity of natural toxins and environmental toxicants to modulate immunity has  
53 potentially serious implication for both mounting an appropriate response to infectious agents  
54 as well as generating an appropriate response during a vaccination protocol (Germolec, 2004;  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Marin et al., 2006). The trichothecenes have a unique capacity to up- and down-regulate immune function by disrupting intracellular signaling within leukocytes (Pestka, 2008). Using human monocyte-derived macrophages, the results presented herein demonstrate that DON prevents in a concentration-dependent manner the IFN- $\gamma$ -induced upregulation of several macrophage activation markers, such as CD14, CD54, CD119 and HLA-DP/DQ/DR.

An important observation of this study is that the immunosuppressive effect of DON on human macrophage could also be observed at low dose of toxin (150 ng/mL or 0.5  $\mu$ M). This contrasted with studies using primary murine macrophages as well as the murine Raw 264.7 cell line, where low doses of DON (100 to 250 ng/mL) had pro-inflammatory effect (Wong et al., 2001; Wong et al., 1998) and high doses of DON induces apoptosis (Yang et al., 2000; Zhou et al., 2005).

IFN- $\gamma$  is the major factor of macrophage activation and macrophage activation is associated with the up-regulation of several cell surface molecules (Schroder et al., 2004). Accordingly, in the present study we observed that the treatment of monocyte-derived macrophages with IFN- $\gamma$  increases the expression of CD14, CD54, CD119 and HLA-DP/DQ/DR. IFN- $\gamma$  is the major factor of macrophage activation. It orchestrates the trafficking of specific immune cells to sites of inflammation through up-regulating expression of chemokines, adhesion molecules, and cell surface markers implicated in macrophage function (Schroder et al., 2004). Once activated, macrophages use a variety of mechanisms to kill microbial targets, especially with the production of reactive oxygen and nitrogen intermediates (Goodbourn et al., 2000). We observed that IFN- $\gamma$ -stimulation increased the cell surface expression of its own receptor (CD119) as well as the cell surface receptor for the lipopolysaccharide (LPS) receptor CD14. Our results also confirmed that IFN- $\gamma$  treatment increases the expression of CD54, also known as ICAM-1, and the expression of MHC class

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

II molecules (HLA-DR/Q/P). These molecules are crucial for the known potent antigen presenting function of IFN- $\gamma$ -activated macrophages.

Modulation of the expression of cell surface markers by DON was already observed *in vitro* in monocytes-derived dendritic cells obtained from pigs (Bimczok et al., 2007) or from human (Hymery et al., 2006). Based on this and the known importance of macrophages and monocyte-derived dendritic cells for the mucosal immune system of the intestinal tract (Varol et al., 2009), high concentrations of DON in food could have a negative effect on mucosal innate and inflammatory responses as well as T-cell immunity required to combat invading pathogens.

The observed suppression of CD119, representing the IFN- $\gamma$  Receptor 1 (IFN $\gamma$ R1), by DON relates to an *in vivo* observation made with mice where CD119 mRNA levels in the lung were reduced in animals infected with a reovirus and exposed to DON (Li et al., 2005).

Our results demonstrating that DON is only active when applied before IFN- $\gamma$  treatment would point on a specific interference with the IFN- $\gamma$  signaling pathway. Binding IFN- $\gamma$  to its receptor induced activation of the receptor-associated Janus kinases Jak1 and Jak2 by transphosphorylation, Jak1 and Jak2 being associated with IFN $\gamma$ R1 and IFN $\gamma$ R2 chains of the IFN $\gamma$  receptor respectively. Upon receptor engagement and Jak activation, a tyrosine residue on the IFN $\gamma$ R1 is phosphorylated and serves as docking site for the cytosolic factor, the Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT1). IFN- $\gamma$  activates predominantly STAT1, which mediates the activating functions of IFN $\gamma$  including enhanced inflammatory cytokine production (Schroder et al., 2004). This Jak/STAT signaling pathway is also able to activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway (Ma et al., 2003; Schroder et al., 2004), which is interesting considering that DON is known to activate MAPK via a process termed the “ribotoxic stress response” (reviewed in Pestka, 2008).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

In principle, the disrupting of IFN stimulation of macrophages could also be attributed to the action of suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins that inhibit JAK/STAT signal transduction. SOCS proteins inhibit signal transduction of type I and II cytokine receptors such as IFN- $\gamma$  receptors by acting at the level of activated receptors and JAKs. It is clear that future studies are required to address the mechanism by which DON interferes with IFN- $\gamma$  mediated macrophage activation (Dalpke et al., 2008).

Taken together, the present study demonstrates that DON interferes with IFN- $\gamma$  mediated human macrophage activation. This relates to the decreased host resistance to several pathogens such as reovirus (Li et al., 2005), *Salmonella enteridis* (Hara-Kudo et al., 1996) or *Listeria monocytogenes* (Tryphonas et al., 1984) after exposure to DON. We propose that the inhibition of IFN- $\gamma$ -induced macrophage activation could contribute to the immunotoxic effect of this toxin.

### **Conflicts of interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### **Acknowledgements**

This work was financially supported by the French National program of coordination INRA-AFSSA PORC-DON project. Y. Waché was supported by an AFSSA PhD thesis fellowship.

## References:

- 1  
2  
3  
4  
5 Accensi, F., Pinton, P., Callu, P., Abella-Bourges, N., Guelfi, J.F., Grosjean, F., Oswald, I.P.,  
6 2006. Ingestion of low doses of deoxynivalenol does not affect hematological,  
7 biochemical, or immune responses of piglets. *J. Anim. Sci.* 84, 1935-1942.
- 8 Bimczok, D., Doll, S., Rau, H., Goyarts, T., Wundrack, N., Naumann, M., Danicke, S.,  
9 Rothkotter, H.J., 2007. The Fusarium toxin deoxynivalenol disrupts phenotype and  
10 function of monocyte-derived dendritic cells *in vivo* and *in vitro*. *Immunobiology* 212,  
11 655-666.
- 12  
13 Bryden, W.L., 2007. Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asia Pac J*  
14 *Clin. Nutr.* 16 Suppl 1, 95-101.
- 15 CAST, 2003. Mycotoxins: Risks in plant, Animal, and Human Systems. Task Force report  
16 No 139, Ames, Iowa, USA.
- 17  
18 Chung, Y.J., Yang, G.H., Islam, Z., Pestka, J.J., 2003. Up-regulation of macrophage  
19 inflammatory protein-2 and complement 3A receptor by the trichothecenes  
20 deoxynivalenol and satratoxin G. *Toxicology* 186, 51-65.
- 21 Dalpke, A., Heeg, K., Bartz, H., Baetz, A., 2008. Regulation of innate immunity by  
22 suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins. *Immunobiology* 213, 225-235.
- 23 Döll, S., Schrickx, A.J., Dänicke, S., Fink-Gremmels, J., 2009. Deoxynivalenol-induced  
24 cytotoxicity, cytokines and related genes in unstimulated or lipopolysaccharide  
25 stimulated primary porcine macrophages. *Toxicol. Lett.* 184, 97-106.
- 26 Germolec, D.R., 2004. Sensitivity and predictivity in immunotoxicity testing: immune  
27 endpoints and disease resistance. *Toxicol. Lett.* 149, 109-114.
- 28 Goodbourn, S., Didcock, L., Randall, R.E., 2000. Interferons: cell signalling, immune  
29 modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 81, 2341-2364.
- 30 Hara-Kudo, Y., Sugita-Konishi, Y., Kasuga, F., Kumagai, S., 1996. Effects of deoxynivalenol  
31 on *Salmonella enteridis* infection. *Mycotoxins* 42, 51-55.
- 32 Hymery, N., Sibiril, Y., Parent-Massin, D., 2006. *In vitro* effects of trichothecenes on human  
33 dendritic cells. *Toxicol. In Vitro* 20, 899-909.
- 34 Jackson, L.S., Bullerman, L.B., 1999. Effect of processing on Fusarium mycotoxins. *Adv.*  
35 *Exp. Med. Biol.* 459, 243-261.
- 36 Ji, G.E., Park, S.Y., Wong, S.S., Pestka, J.J., 1998. Modulation of nitric oxide, hydrogen  
37 peroxide and cytokine production in a clonal macrophage model by the trichothecene  
38 vomitoxin (deoxynivalenol). *Toxicology* 125, 203-214.
- 39 Jia, Q., Zhou, H.R., Shi, Y., Pestka, J.J., 2006. Docosahexaenoic acid consumption inhibits  
40 deoxynivalenol-induced CREB/ATF1 activation and IL-6 gene transcription in mouse  
41 macrophages. *J. Nutr.* 136, 366-372.
- 42 Li, M., Cuff, C.F., Pestka, J., 2005. Modulation of murine host response to enteric reovirus  
43 infection by the trichothecene deoxynivalenol. *Toxicol. Sci.* 87, 134-145.
- 44 Ma, J., Chen, T., Mandelin, J., Ceponis, A., Miller, N.E., Hukkanen, M., Ma, G.F., Konttinen,  
45 Y.T., 2003. Regulation of macrophage activation. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 2334-2346.
- 46 Marin, D.E., Taranu, I., Pascale, F., Lionide, A., Burlacu, R., Bailly, J.D., Oswald, I.P., 2006.  
47 Sex-related differences in the immune response of weanling piglets exposed to low doses  
48 of fumonisin extract. *Br. J. Nutr.* 95, 1185-1192.
- 49 Moon, Y., Pestka, J.J., 2002. Vomitoxin-induced cyclooxygenase-2 gene expression in  
50 macrophages mediated by activation of ERK and p38 but not JNK mitogen-activated  
51 protein kinases. *Toxicol. Sci.* 69, 373-382.
- 52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1 Moon, Y., Pestka, J.J., 2003. Deoxynivalenol-induced mitogen-activated protein kinase  
2 phosphorylation and IL-6 expression in mice suppressed by fish oil. *J. Nutr. Biochem.*  
3 14, 717-726.
- 4 Oswald, I.P., Comera, C., 1998. Immunotoxicity of mycotoxins. *Rev. Med. Vet.* 149, 585-  
5 590.
- 6 Oswald, I.P., Marin, D.E., Bouhet, S., Pinton, P., Taranu, I., Accensi, F., 2005.  
7 Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. *Food Addit. Contam.* 22,  
8 354-360.
- 9 Parent-Massin, D., Fuselier, R., Thouvenot, D., 1994. In vitro toxicity of trichothecenes on  
10 human haematopoietic progenitors. *Food Addit. Contam.* 11, 441-447.
- 11 Pestka, J., Zhou, H.R., 2006. Toll-like receptor priming sensitizes macrophages to  
12 proinflammatory cytokine gene induction by deoxynivalenol and other toxicants.  
13 *Toxicol. Sci.* 92, 445-455.
- 14 Pestka, J.J., 2008. Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis.  
15 *Food Addit. Contam.*, 1-13.
- 16 Pestka, J.J., Smolinski, A.T., 2005. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on  
17 humans. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit Rev* 8, 39-69.
- 18 Pinton, P., Accensi, F., Beauchamp, E., Cossalter, A.M., Callu, P., Grosjean, F., Oswald, I.P.,  
19 2008. Ingestion of deoxynivalenol (DON) contaminated feed alters the pig vaccinal  
20 immune responses. *Toxicol. Lett.* 177, 215-222.
- 21 Rotter, B.A., Prelusky, D.B., Pestka, J.J., 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J.*  
22 *Toxicol. Environ. Health* 48, 1-34.
- 23 Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A., 2004. Interferon-gamma: an overview of  
24 signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163-189.
- 25 SCOOP, 2003. Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of  
26 dietary intake of the population of EU member states. Directorate-general health and  
27 consumer protection. Available : <http://europa.eu.int:comm/food:fs:scoop:task3210.pdf>  
28 (Accessed Avr 20, 2009).
- 29 Sugita-Konishi, Y., Pestka, J.J., 2001. Differential upregulation of TNF-alpha, IL-6, and IL-8  
30 production by deoxynivalenol (vomitoxin) and other 8-ketotrichothecenes in a human  
31 macrophage model. *J. Toxicol. Environ. Health A* 64, 619-636.
- 32 Tryphonas, H., O'Grady, L., Arnold, D.L., McGuire, P.F., Karpinski, K., Vesonder, R.F.,  
33 1984. Effect of deoxynivalenol (vomitoxin) on the humoral immunity of mice. *Toxicol.*  
34 *Lett.* 23, 17-24.
- 35 Turner, P.C., Rothwell, J.A., White, K.L., Gong, Y., Cade, J.E., Wild, C.P., 2008. Urinary  
36 deoxynivalenol is correlated with cereal intake in individuals from the United kingdom.  
37 *Environ. Health Perspect.* 116, 21-25.
- 38 Varol, C., Yona, S., Jung, S., 2009. Origins and tissue-context-dependent fates of blood  
39 monocytes. *Immunol. Cell. Biol.* 87, 30-38.
- 40 Wong, S., Schwartz, R.C., Pestka, J.J., 2001. Superinduction of TNF-alpha and IL-6 in  
41 macrophages by vomitoxin (deoxynivalenol) modulated by mRNA stabilization.  
42 *Toxicology* 161, 139-149.
- 43 Wong, S.S., Zhou, H.R., Marin-Martinez, M.L., Brooks, K., Pestka, J.J., 1998. Modulation of  
44 IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha secretion and mRNA expression by the trichothecene  
45 vomitoxin in the RAW 264.7 murine macrophage cell line. *Food Chem. Toxicol.* 36,  
46 409-419.
- 47 Yan, D., Rumbleha, W.K., Pestka, J.J., 1998. Experimental murine IgA nephropathy  
48 following passive administration of vomitoxin-induced IgA monoclonal antibodies. *Food*  
49 *Chem. Toxicol.* 36, 1095-1106.
- 50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 Yang, G.H., Jarvis, B.B., Chung, Y.J., Pestka, J.J., 2000. Apoptosis induction by the  
2 satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p38 MAPK, and  
3 SAPK/JNK activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164, 149-160.  
4 Zhou, H.R., Islam, Z., Pestka, J.J., 2005. Induction of competing apoptotic and survival  
5 signaling pathways in the macrophage by the ribotoxic trichothecene deoxynivalenol.  
6 *Toxicol. Sci.* 87, 113-122.  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Table 1: Effect of DON on CD54 expression by human monocyte-derived macrophages: comparison of two sequential treatments.

DON concentration ( $\mu$ M)	Sequential treatment of the macrophages			
	-----		-----	
	DON before IFN- $\gamma$		IFN- $\gamma$ before DON	
0	100%	NS	100%	NS
0.1	94.7 $\pm$ 9.7	NS	112.0 $\pm$ 6.3	NS
0.2	86.0 $\pm$ 8.9	NS	115.2 $\pm$ 4.8	NS
0.5	73.6 $\pm$ 9.8	*	97.8 $\pm$ 8.0	NS
1	57.7 $\pm$ 7.8	*	97.5 $\pm$ 10.0	NS
2	50.7 $\pm$ 5.0	***	89.6 $\pm$ 12.0	NS
5	43.7 $\pm$ 5.9	***	83.0 $\pm$ 12.2	NS

Human MDMs were obtained as described in the material and methods and were treated sequentially with (i) different concentrations of DON and 100 ng/mL IFN- $\gamma$  or (ii) IFN- $\gamma$  and different concentration of DON. The values are expressed as % expression of CD54 when compared with IFN only treated cells; means  $\pm$  SEM (n=3) of three independent experiments with different donors.

Paired student t test were used to compare DON/IFN- $\gamma$ -treated and IFN- $\gamma$ -treated cells: NS, not significant; \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.



Figure legend

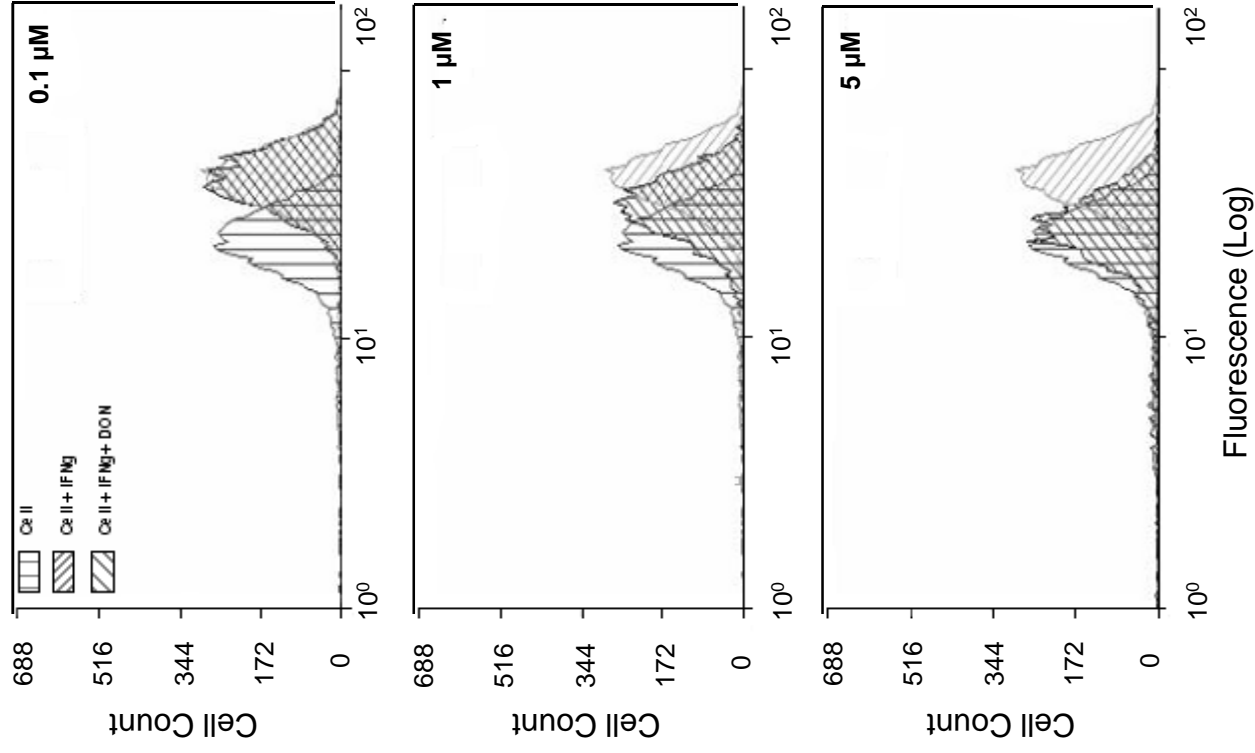
1  
2  
3 **Figure 1:** Effect of DON on the cell surface expression of CD54 on human macrophages  
4 stimulated with IFN- $\gamma$ .  
5  
6

7  
8 Human monocyte-derived macrophages were treated for 18 hours with DON (0 to 5 $\mu$ M) and  
9 then activated for further 18 hours with recombinant human IFN- $\gamma$  (100 ng/mL). Unstimulated  
10 cells were used as control. After incubation, macrophages were stained for CD54 with  
11 specific antibody and mean fluorescence intensity was analyzed by flow cytometry. Panel A:  
12 data obtained from a representative donor. Panel B: means  $\pm$  SEM of six different donors.  
13  
14 Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

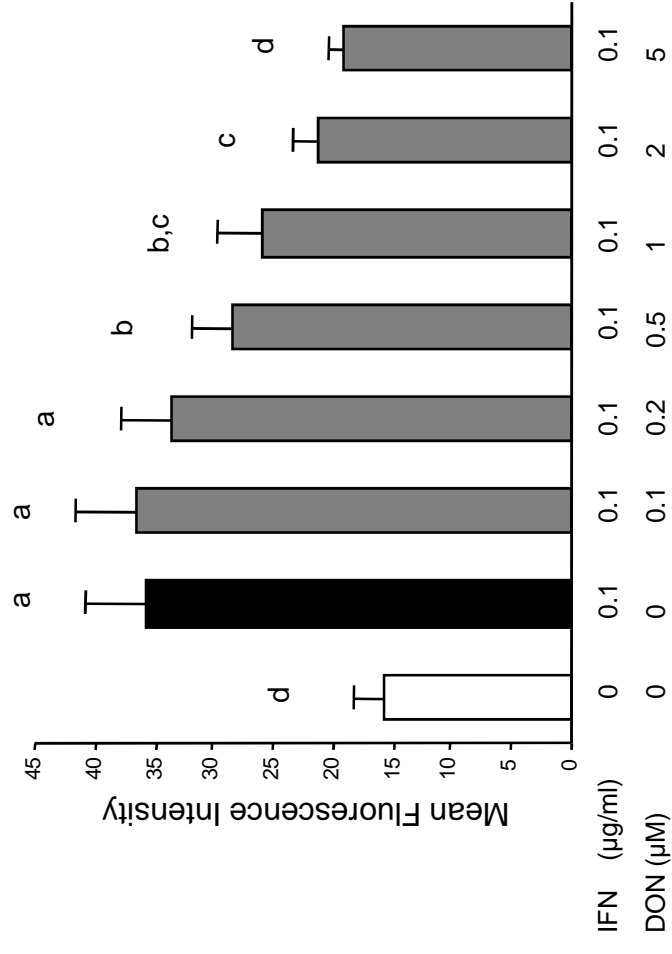
25 **Figure 2:** Effect of DON on the cell surface expression of different activation markers on  
26 human macrophages stimulated with IFN- $\gamma$ .  
27  
28

29 Human monocyte-derived macrophages were treated for 18 hours with DON (0 to 5 $\mu$ M) and  
30 then activated for further 18 hours with recombinant human IFN- $\gamma$  (100 ng/mL). Unstimulated  
31 cells were used as control. After incubation, macrophages were stained for different activation  
32 markers with specific antibody and mean fluorescence intensity were analyzed by flow  
33 cytometry. Data are means  $\pm$  SEM of six different donors. Bars with different letters are  
34 significantly different ( $P < 0.05$ ).  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

(A)

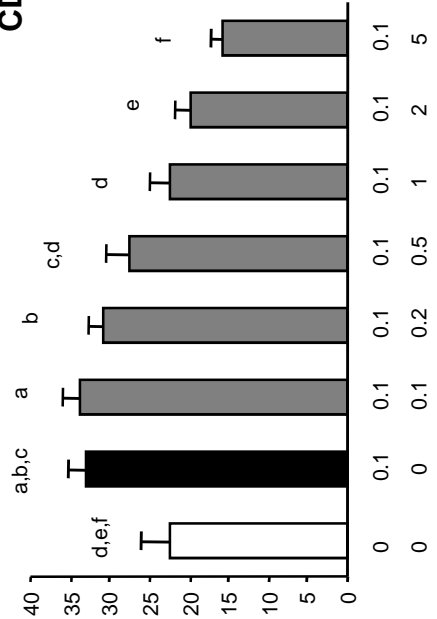


(B)

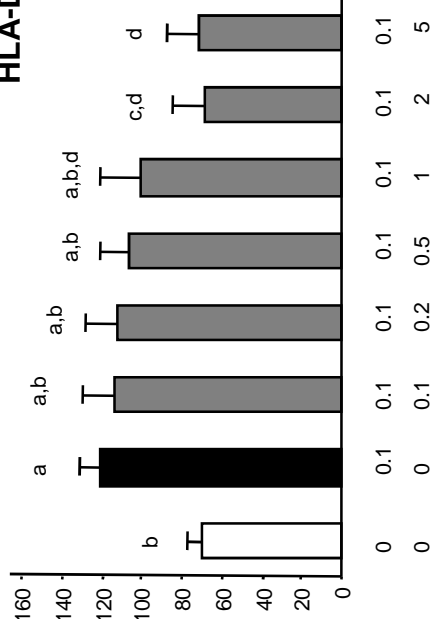


Waché *et al.*, Figure 2

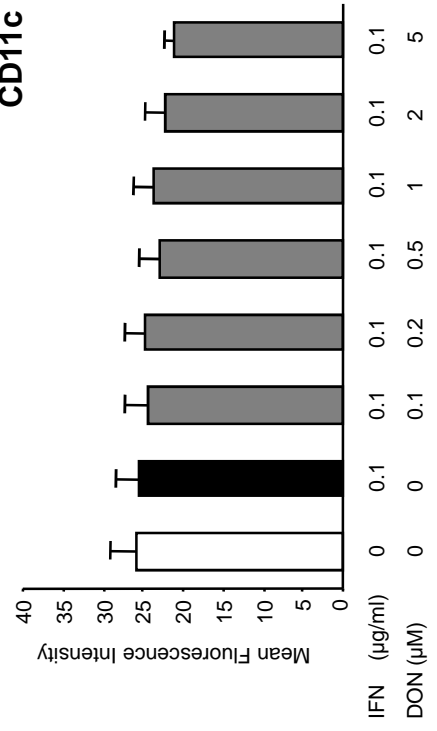
**CD14**



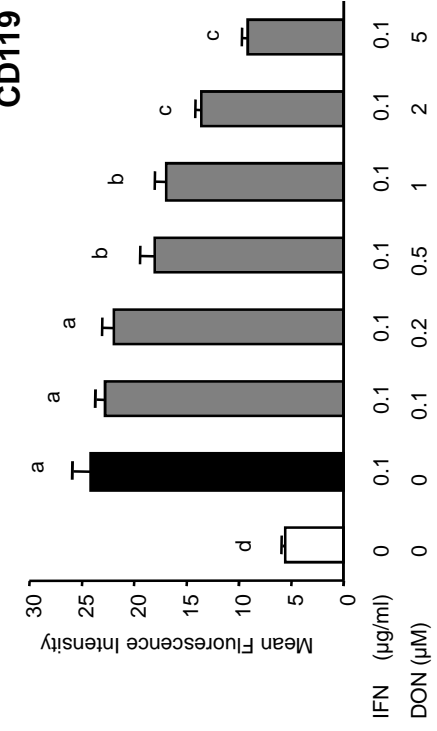
**HLA-DR/Q/P**



**CD11c**



**CD119**



## **2. Effet du DON sur les fonctions des neutrophiles porcins stimulés par du LPS**

Dans la deuxième partie de notre étude *in vitro*, nous avons étudié les effets du DON sur les neutrophiles porcins. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'action du DON sur la capacité de phagocytose des neutrophiles, leur propriété de chimiotactisme ainsi que la modulation de la production de l'IL-8 lors d'une stimulation au LPS. Cette dernière analyse a été complétée par la recherche du mode d'action du DON au niveau intracellulaire.

Des échantillons de sang ont été prélevés au niveau de la veine jugulaire gauche de six porcs sains, élevés au sein de l'animalerie expérimentale de l'INRA de Toulouse. Les neutrophiles ont ensuite été isolés après une séparation des leucocytes sanguins par une méthode de gradient de densité, et incubés en milieu de culture supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) 5%.

En premier lieu, nous avons voulu déterminer le niveau de cytotoxicité du DON envers les neutrophiles porcins. En mesurant la libération de la lactate déshydrogénase (LDH), une enzyme intracellulaire relarguée dans les surnageants de culture après apoptose des cellules, les doses de DON en dessous de 50  $\mu\text{M}$  (15  $\mu\text{g/ml}$ ) sont apparues non-cytotoxiques pour les neutrophiles porcins. L'utilisation de la cytométrie de flux n'a pas révélé d'effet du DON sur la capacité des neutrophiles à phagocyter des bactéries *E. coli* marquées à la Fluorescéine isothiocyanate (FITC), pour des concentrations de 0,5 à 50  $\mu\text{M}$  (0,15 à 15  $\mu\text{g/ml}$ ). En revanche, une pré-exposition des cellules au DON de 50  $\mu\text{M}$  pendant 30 minutes a réduit de 42 % les propriétés de chimiotactisme des cellules en réponse à une concentration de 5  $\mu\text{g/ml}$  d'IL-8. Proportionnellement à la dose employée, le DON a diminué la production d'IL-8 par les neutrophiles, préalablement stimulés au LPS. L'exposition des cellules au LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ) ou au DON (3  $\mu\text{g/ml}$ ) a montré une augmentation significative de l'expression de la sous-unité p65 des facteurs de transcription NF- $\kappa\text{B}$ , alors qu'une co-exposition du DON et du LPS diminue fortement l'expression de cette protéine comparée aux cellules non-traitées.

En conclusion, notre étude confirme que des doses modérées de DON peuvent altérer les capacités fonctionnelles de neutrophiles porcins, notamment par son action synergique avec l'endotoxine sur les facteurs de transcription NF- $\kappa\text{B}$ .

**Les résultats de ce travail sont présentés ici sous la forme d'un article scientifique, en vue d'être très prochainement soumis dans une revue internationale.**

Deoxynivalenol, DON, disrupts the immune function and IL-8 production in  
porcine neutrophils

Waché Y.J.<sup>1</sup>, Taranu I.<sup>1</sup>, Braicu C.<sup>1</sup>, Laffitte J.<sup>1</sup>, Saeedikouzehkonani N.<sup>1</sup>, Pinton P.<sup>1</sup>, Mori  
Y.<sup>2</sup>  
and Oswald I.P.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> INRA–Unité de pharmacologie - Toxicologie, 180 chemin de Tournefeuille, 31931 Toulouse  
cedex 9 - FRANCE

<sup>2</sup> NIAH- 3-1-5, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, JAPAN – 305-0856

\* Corresponding author: E-mail adress: [isabelle.oswald@toulouse.inra.fr](mailto:isabelle.oswald@toulouse.inra.fr)

INRA, Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie UR66, 180 chemin de Tournefeuille BP3,  
31027 Toulouse cedex 3, France.

Tel: +33 5 61 28 54 80. Fax: +33 5 61 28 53 10.

**Abstract :**

Deoxynivalenol (DON), a mycotoxin produced by *Fusarium* spp., is a frequent contaminant of cereals. DON causes toxicological effects in laboratory and domestic animals including pigs. It modulates the function of several immune cells types but only few studies have investigated the effect of DON on polymorphonuclear cells (PMNs). The aim of the present study was to determine the effects of DON on PMNs, the first line of defense against infection. We first verified that low concentrations of DON did not exert any cytotoxic effect on PMNs. Indeed significant LDH release was only observed for DON concentrations greater than 50  $\mu$ M on cells isolated from blood of healthy pigs. We first observed that the phagocytosis of FITC-labeled *E. coli* by PMNs was not modulated by DON used at concentration up to 50  $\mu$ M. By contrast, the toxin decreased the chemotactism of PMN upon IL-8 attraction. DON also reduced the LPS-induced secretion of IL-8 by PMNs in a dose dependant manner. Further experiments established that exposure of PMNs to 10 $\mu$ M DON or 10  $\mu$ g/mL LPS significantly increased the expression of the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 subunit, whereas co-exposure of PMNs with DON and LPS decrease the expression of this protein to the level observed in control untreated cells. This study provides evidence that low concentration of DON can alter the functional capacities of porcine PMNs and suggest the involvement of NF- $\kappa$ B. These immunosuppressive effects of DON may have implication for man and animals when eating contaminated food or feed.

**Keywords:** *Fusarium* mycotoxin, Deoxynivalenol, Pigs, IL-8, Phagocytosis, Neutrophils, Chemotactism, Cytokines, Nuclear factor- $\kappa$ B.

## **Introduction:**

Food safety is a major issue in Europe. In this respect much attention needs to be paid to the possible contamination of food by fungi and the risk of toxin production. Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi that may contaminate all stages of the food chain. Their global occurrence is regarded as an important risk factor for human and animal health as up to 25% of the world crop production may be contaminated with mycotoxins (CAST, 2003). The toxicological syndromes caused by ingestion of mycotoxins range from death, induction of cancer and growth impairment (CAST, 2003; Bryden, 2007). Consumption of fungal toxins may also decrease resistance to infectious diseases (Oswald *et al.*, 2005).

Deoxynivalenol (DON) is a mycotoxin of the trichothecenes family that is mainly produced by *Fusarium graminearum* and *F. culmorum*. DON is commonly detected in cereals and grains, particularly in wheat, barley, maize and their by-products (Schothorst and van Egmond, 2004). It is the most prevalent contaminating mycotoxin in crop production in Europe and North America (Schothorst and van Egmond, 2004). Furthermore, this toxin is resistant to milling, processing and heating and, therefore, readily enters the food and feed chains (Sugita-Konishi *et al.*, 2006).

DON exhibits toxic effects in humans as well as in all animal species so far investigated (Rotter *et al.*, 1996; Pestka and Smolinski, 2005). Among animal species, pigs show great sensitivity to DON, and, because of the high percentage of wheat in pig diets, swine could be exposed to this toxin. Considering that the gastrointestinal tract and the immune system of the pig are very similar to that of humans, the pig can be regarded as a good model that can be applied to humans (Almond, 1996; Rothkotter *et al.*, 2002).

Acute exposure to high doses induces radiomimetic effects including diarrhea, vomiting, leukocytose, hemorrhage/necrosis of the gastrointestinal tract. Chronic toxicity studies showed anorexia, reduced weight gain, altered nutritional efficiency and immunomodulation (Eriksen and Pettersson, 2004; Pestka and Smolinski, 2005; Pinton *et al.*, 2008). At the cellular level DON interacts with the peptidyltransferase at the 60S ribosomal subunit level, triggering a translational arrest (Ueno, 1984).

Immune cells, are a primary target for DON, and depending on dose and frequency of exposure, DON can be either immunosuppressive or immunostimulatory (Pestka, 2008). Immunomodulatory effects of DON has been described on macrophages (Zhou *et al.*, 2005; Pestka and Zhou, 2006; Waché *et al.*, submitted), natural killer cells (Berek *et al.*, 2001), lymphocytes (Warner *et al.*, 1994; Islam *et al.*, 2002; Pestka *et al.*, 2005; Pestka, 2008) dendritic cells (Hymery *et al.*, 2006; Bimczok *et al.*, 2007) but very few studies have

investigated the effect of DON on neutrophils (Richetti *et al.*, 2005; Takayama *et al.*, 2005). Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) constitute the first line of defense against intruding microorganisms, they can migrate to the inflammatory site by chemotaxis, to phagocytose microorganisms and to synthesize various cytokines and chemokines such as IL-8 (Scapini *et al.*, 2000; Witko-Sarsat *et al.*, 2000).

Using the pig model, the aim of the present study was to evaluate the effect of DON on several functions of neutrophils (phagocytosis, chemotaxis and IL-8 synthesis) and to investigate the underlying mechanism.

## **Materials and methods:**

### **Reagents:**

Lymphocyte separation medium (density 1.077), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Hank's buffer salt solution (HBSS) were obtained from Eurobio (Les Ulis, France). Fetal Calf Serum (FCS) was purchased from Perbio (Brebieres, France). Penicillin, streptomycin, L-glutamine, trypan blue, phosphate buffer saline (PBS), NH<sub>4</sub>Cl, EDTA, KHCO<sub>3</sub>, triton X-100, citric acid, sodium citrate, 2,2'-azino-di-(3-ethyl)dithiazoline sulfonic acid (ABTS), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dimethylsulfoxide (DMSO), Sodium-Dodecyl-Sulfate (SDS), lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* 0111:B4 and DON were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) and Tetramethylbenzidine (TMB) were purchased from Pierce (Rockford, USA). DON was dissolved in DMSO to obtain a 5 mM stock solution, which was frozen at -20°C and a series of diluted working solutions were prepared before adding to the neutrophils suspension.

### **Animals :**

Twelve crossbred pigs were used in this study, in accordance with the National Institute of Health Guide and the French Ministry of Agriculture for the Care and the Use of Laboratory Animals. They were acquired locally just after weaning, at 4 weeks of age, and housed in floored indoor pens in the animal facility of the INRA laboratory of Pharmacology and Toxicology (Toulouse, France). Animals were acclimatized two weeks prior to being used for the experimental sampling collection, between 6 to 12 weeks of age.



### Sampling collection and neutrophils isolation:

Blood samples were aseptically collected from the left jugular vein of pigs in sodium heparin tubes (Vacutainer<sup>®</sup>, Becton-Dickinson, USA). Neutrophils were isolated using a modification of the method described by (Boyum *et al.*, 1991). Briefly, 60 mL of blood, collected on heparinized tubes, was diluted with an equal volume of HBSS. Thirty mL of diluted blood were gently layered over 20 mL of lymphocyte separation medium in 50mL tubes and centrifuged at 800g for 25 min. The cell pellet was diluted in ice-cold hypotonic lysis solution (155 mM NH<sub>4</sub>CL, 0.1 mM EDTA, 10 mM KHCO<sub>3</sub>), and kept on ice to lyse the erythrocytes. After centrifugation, neutrophils were washed two times with HBSS solution and re-suspended in DMEM, supplemented with 10% FCS, 2mM l-glutamine, 100 U.mL<sup>-1</sup> penicillin and 50µg.mL<sup>-1</sup> streptomycin. The proportion of neutrophil as determined by microscopical observation after Giemsa coloration was greater than 95% and their viability was over 95% as assessed by trypan blue exclusion.

### LDH cytotoxicity test:

The cytotoxic effect of DON on neutrophils was evaluated by measuring the release of lactate dehydrogenase (LDH) in the culture media using the CytoTox 96<sup>®</sup> Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Charbonnières, France) as already described (Bouhet *et al.*, 2004). Briefly, neutrophils seeded in 96-well plate (5 x 10<sup>5</sup> cells/well in 150µL of complete DMEM/10% FCS, were stimulated with 10 µg.mL<sup>-1</sup> LPS, and treated simultaneously with various concentration of DON (0 to 200 µM). Each experimental concentration was tested in triplicate well. Untreated cells were used as control cells. Plates were incubated at 38°C in 5% CO<sub>2</sub> for 8 hours. The supernatants were removed into new plate, and the cell pellets in each well were lysed with 150 µL 0.8% Triton X-100 (w/v) diluted in HBSS. After two serial frozen steps at -20°C for each plate, LDH activity was measured on 50 µl of supernatant, according to the manufacturer's instructions, and the absorbance was read at 492 nm on an ELISA plate reader (Spectra Thermo Tecan, Trappes, France). The maximal LDH release was calculated by adding the LDH measured in cell pellet and in the supernatant. Results were expressed as percentage of LDH released in the supernatant in comparison with total LDH.

### Determination of interleukin 8 (IL-8) concentration by ELISA

Neutrophils cultured as already described were stimulated or not with  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  LPS, and treated with non-cytotoxic concentration of DON (0 to  $50 \mu\text{M}$ ) for 8 hours. Culture supernatant were then collected and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until analysis. CXCL/IL-8 concentration was determined using a commercialized ELISA (DuoSet<sup>®</sup> kit, R&D Systems, Lille, France) as already described (Bouhet *et al.*, 2006). Briefly, the monoclonal anti-porcine CXCL/IL-8 (clone 105105) was used as capture antibodies in conjunction with polyclonal biotinylated goat anti-porcine IL8 antibody as detecting antibody. HRP and TMB were used for detection. Absorbance was read at 450nm with an ELISA plate reader (Spectra Thermo Tecan, Trappes, France) and the Biolise 2.0 data management software (Labsystems, cergy-Pontoise, France). Cytokine production was quantified by reference to standard curves constructed with known concentration of recombinant porcine IL-8. All samples were run in triplicate. Results were expressed as picograms of IL-8 per mL.

### Phagocytosis of latex microspheres and FITC-labeled *Escherichia coli*

Uptake of *E. coli* bacteria by neutrophils, was measured with the Phagotest<sup>®</sup> kit (Orpegen Pharma, Heidelberg, Germany) according to the manufacturer's instruction with slight modifications. Briefly,  $20 \mu\text{L}$  of FITC-labeled *E. coli* bacteria were added to a  $100 \mu\text{L}$  suspension of  $5 \times 10^5$  cells neutrophils previously treated or not with DON ( $38^\circ\text{C}$ , 30 minutes). The resulting cell suspension was further incubated for 30 min at  $38^\circ\text{C}$ . Cells were then put on ice, and  $100 \mu\text{L}$  of ice-cold quenching solution was added. Neutrophils kept on ice were used as negative controls group and cells incubated at  $38^\circ\text{C}$  without DON-treatment were considered as positive control group. After washings, 10 000 cells were analyzed on Cyan<sup>™</sup> ADP flow cytometer with the Summit 4.3 DakoCyan<sup>™</sup> software (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Results were expressed as the percentage of neutrophils with phagocytic activity in treated group in comparison to neutrophils with phagocytic activity in the positive control group.

### Chemotaxis assay:

Neutrophils migration was measured in Transwell filters as already described by (Somersalo *et al.*, 1990). Briefly,  $2 \text{ mL}$  of neutrophils ( $5 \times 10^5$  cells) were incubated at  $38^\circ\text{C}$  for 30 min in serum-free DMEM, with non-cytotoxic concentration of DON (0 to  $50 \mu\text{M}$ ).  $100 \mu\text{L}$  of cell suspension were then transferred in the Chemocell<sup>®</sup> Transwell filters (Kurabo, Tokyo, Japan) placed in 24-well plates containing  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  recombinant porcine IL-8 in 450

$\mu\text{L}$  HBSS acting as a chemoattractant for neutrophils (Cassatella, 1995). Supplementary wells were allocated for controls without chemoattractant. The neutrophils were allowed to migrate for 2h at  $38^{\circ}\text{C}$  and the number of migrated neutrophils were measured by myeloperoxidase (MPO) activity, a specific marker of neutrophil identification, as previously described (Roselli *et al.*, 2006). Briefly, transmigrated neutrophils harvested in the basal compartment were lysed with  $100\ \mu\text{L}$  of lysis buffer (0.5% Triton X-100, 0.1mM citrate buffer, pH 4.2). MPO activity was assayed by reading the optical density at 405 nm, after addition of an equal volume of 0.1 mM citrate buffer containing 1 mM ABTS and 10 mM of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . After appropriate color development, the reaction was stopped with 20% SDS (v:v). The number of migrated neutrophils was calculated from a standard curve established from known concentrations of the same neutrophil preparation used in each experiment. The standard curve was linear in the range of 0.5 to  $20 \times 10^4$  cells. The measurement MPO activity was negligible in lysates of control well, since data represented less than  $10^3$  cells, reflecting the potential passive migration of neutrophils.

#### Cells protein extraction, SDS-PAGE, and immunoblotting for phosphorylated NF- $\kappa\text{B}$ p65 detection.

Neutrophils, seeded in 6-well plates ( $1 \times 10^5$  cells/well in 10mL of complete DMEM/) were treated with  $10\ \mu\text{M}$  DON for 30 minutes, stimulated with  $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  LPS and further incubated for 3.5 hours. Cells were then washed with ice-cold PBS supplemented with a mix of antiproteases (Complete Protease Inhibitor Cocktail tablets, Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN, USA), lysed in  $250\ \mu\text{L}$  buffer [2% (w/v) SDS, 1.0 mM sodium ortho-vanadate, DTT, 50mM, 20% glycerol, 0.2% bromphenol blue and 62.5 mM Tris, pH 6.8], and sonicated for 30 seconds. Proteins ( $10\mu\text{g}$  per lane) were separated on 12% SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose membrane as already described (Meissonnier *et al.*, 2007). The membranes were blocked for 2 hours with PBS-Tween 5% skimmed milk and incubated with rabbit anti-human phosphorylated NF- $\kappa\text{B}$  p65 or rabbit anti-human  $\beta$ -actin (Cell-Signaling, Danvers, MA, USA) antibodies diluted 1:500 and 1:1000 in PBS-Tween-milk respectively. After washing, they were incubated with 1:10000 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG. Antibody binding was detected with the SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce, Brebières, France) after placing the membrane against Hyperfilm<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Signal intensities were estimated using Molecular-Imager<sup>®</sup> Gel Doc<sup>TM</sup> and Quantity One<sup>®</sup> software (Biorad, Marne la Coquette, France).

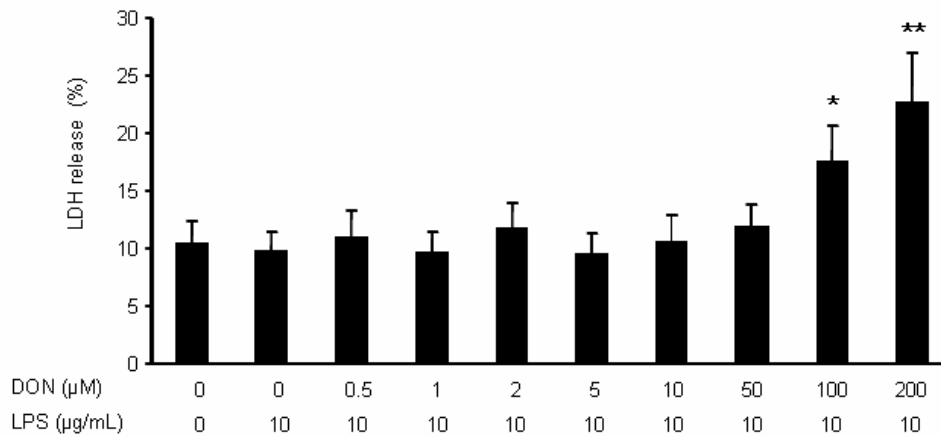


Figure 1: Cytotoxicity of DON on porcine PMNs as measured by the LDH release assay. PMNs were seeded in 96 well-plates, stimulated with LPS (10 μg/mL) and treated for 8 hours with increasing concentrations of DON. LDH activity was then measured in the supernatant. Values are expressed as mean ± SEM of values obtained from PMNs from three animals. Values significantly different from the untreated PMN are shown with \* p<0.001.

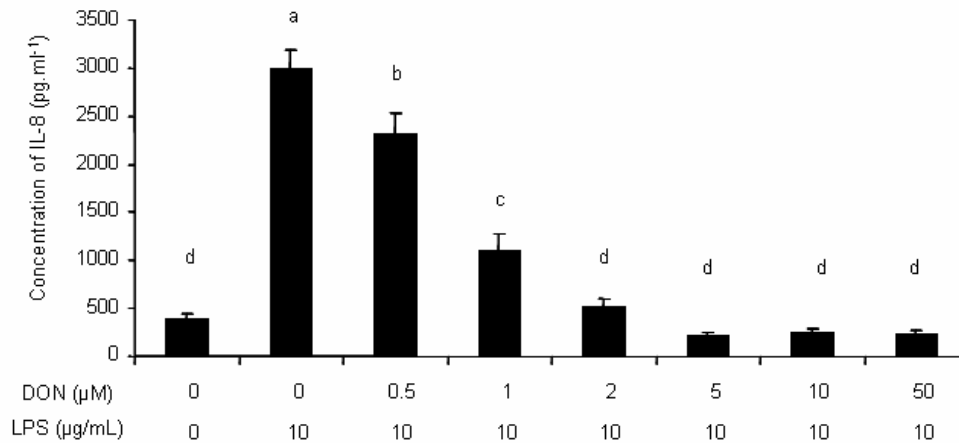


Figure 2: Effect of DON on the production of IL-8 by porcine PMNs. PMNs cultured at the density of  $5 \cdot 10^5$  cells/well and stimulated with 10 μg/mL LPS were incubated with increasing concentrations of DON. Culture supernatants were collected and concentrations of IL-8 were measured by ELISA. Results from 6 independent experiments are expressed as mean ± SEM. Data not sharing the same letter are significantly different (p<0.05).

### Statistical analyses:

Data are mean  $\pm$  SEM. The effect of DON was determined by comparing DON treated cells with control on treated cells using a student t test, after checking for variance homogeneity (Hartley's test). Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

### **Results:**

#### Effect of DON on PMN cytotoxicity:

Before investigating the effects of DON on several functions of PMNs, we wanted to determine the cytotoxicity of DON on this cell type. PMNs were cultured for 8 hours with various concentration of DON and the cytotoxic effect of the toxin was evaluated by measuring LDH release in the extracellular medium, directly related to the quantity of dead cells. As shown in Figure 1, DON did not exert any cytotoxic effect on PMNs when used at concentration ranging from 0.5 to 50  $\mu$ M. At higher concentrations (100 and 200  $\mu$ M) the cytotoxic effect of DON increased with the concentration of toxin. All further experiments were done at non-cytotoxic concentrations of DON.

#### Effect of DON on PMNs phagocytosis:

We first investigated the influence of DON on the phagocytic capacities of PMNs. Purified PMNs, treated for 30 min with increasing concentration of DON, were incubated at 4°C or 38°C with FITC-labelled *Escherichia coli* for 30 min. The percentage of PMNs demonstrating phagocytic activity was assed by Flow cytometry. As shown in Figure 2A, when PMNs were incubated at 4°C, the non-phagocytic cells as determined by their low level of fluorescence (MFI = 8.59), represent 90.9 % of the total PMNs. By contrast, when PMNs were incubated at 38°C, 94.2 % of cells demonstrated a phagocytic activities (MFI = 103.2).When PMNs were incubated with increasing concentration of DON (1 to 50  $\mu$ M) no variation in their ability to phagocyte FITC-labelled *Escherichia coli* was observed and the phagocytic index of the cell population remained closed to 1 (Figure 2B).

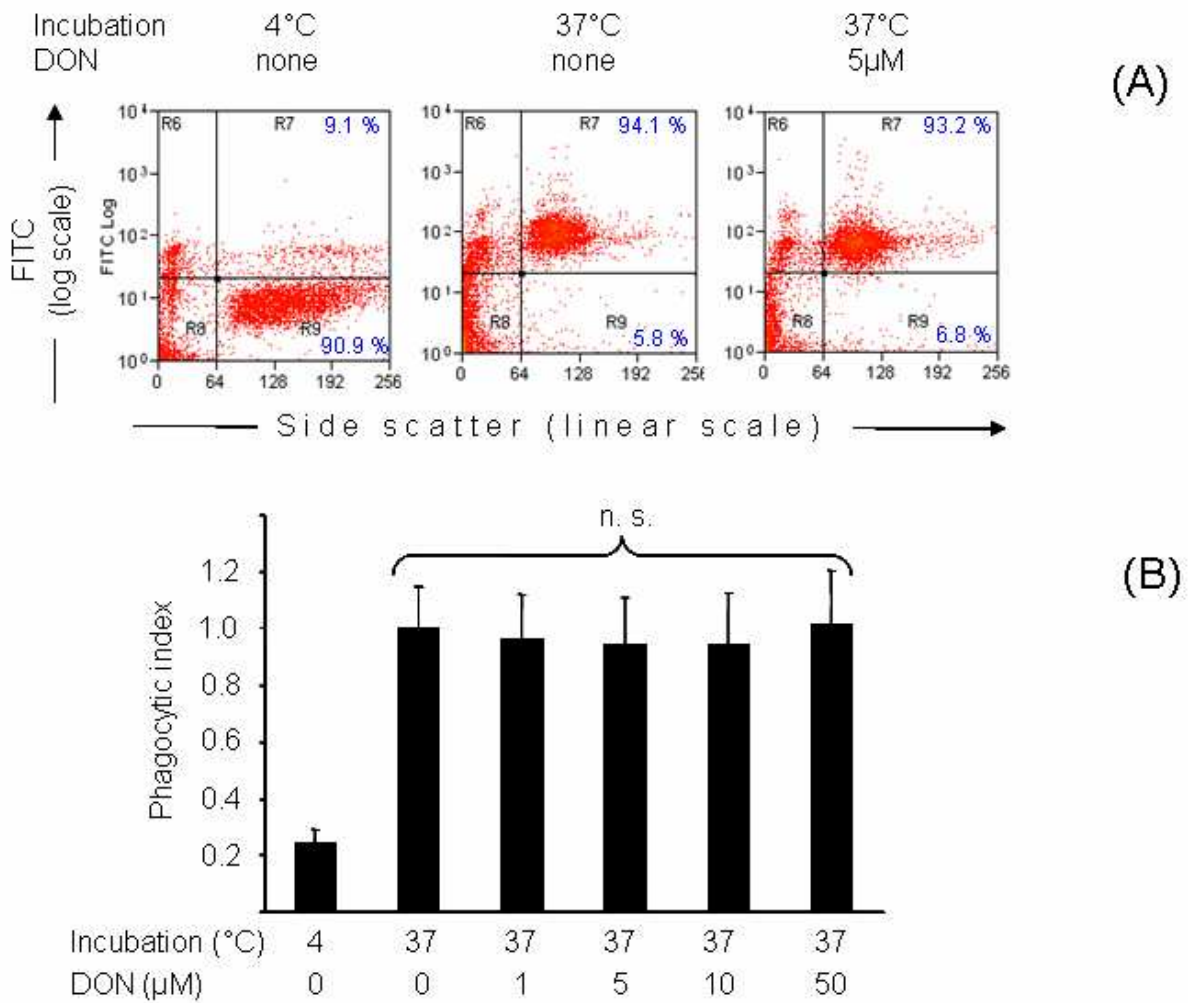


Figure 3: Effect of DON on the phagocytosis capacity of neutrophils. Purified PMNs, treated for 30 min with increasing concentration of DON, were incubated at 4°C or 38°C with FITC-labelled *Escherichia coli* for 30 min. The percentage of PMNs demonstrating phagocytic activity was assed by Flow cytometry. (A) Representative flow cytometry diagrams. (B) Phagocytic index of PMNs. The phagocytic index was calculated as the ratio of PMN with phagocytic activity in cultures incubated at 37°C and treated or not with DON. Data are mean  $\pm$  SEM (ns: not significant)

#### Effect of DON on IL-8 production by PMNs:

We next examined the ability of DON to modulate the synthesis of IL-8. PMNs were stimulated or not with LPS in the presence of non-cytotoxic concentration of DON (0 to 50  $\mu$ M), 8 hours later the cell supernatant was collected and IL-8 concentration measured by specific ELISA (Figure 3). As expected, LPS greatly stimulated the production of IL-8 by porcine PMNs ( $2.99 \pm 0.20$   $\mu$ g/mL versus  $0.39 \pm 0.07$   $\mu$ g/mL) in control unstimulated cells. DON used alone was not able to stimulate IL-8 synthesis (data not shown). When PMNs were treated with LPS and increasing concentration of DON, a dose dependant decrease of IL-8 synthesis was observed. A dose dependant decrease of IL-8 production was observed in LPS stimulated PMNs exposed to increasing concentration of DON. When used at 0.5  $\mu$ M, DON reduced the IL-8 concentration in the supernatant by 23%. At 2 and 5  $\mu$ M DON, the reductions of IL-8 production were 83% and 93 % respectively.

#### Effect of DON on the PMNs chemoattraction:

As PMNs are able to migrate upon chemoattractant, we thus analyzed the influence of DON on this functional activity. PMNs were incubated for 1 hour with 0 to 50 $\mu$ M DON, placed in the upper compartment of transwell filter and 30 min later the number of cells that have migrated in the lower compartment containing IL-8, a potent chemoattractant, was assessed. In absence of IL-8, the number of migrated cells was negligible ( $< 4.10^3$  cells) and, as expected, IL-8 induced a strong migration of PMNs across the transwell filters ( $1.05 \pm 0.11 \times 10^5$  cells). DON treatment reduced the migration of PMNs in a dose dependent manner. A significant decrease was already observed with 10 $\mu$ M DON ( $0.82 \pm 0.11 \times 10^5$  cells,  $P = 0.0021$ ) and, with 50 $\mu$ M DON, the number of migrated PMNs was reduced by 42 % when compared with untreated cells.

#### Detection of phosphorylated NF- $\kappa$ B p65:

Expression of phosphorylated NF- $\kappa$ B p65 was also compared by immunoblotting assay in neutrophils treated with DON (10  $\mu$ M) only, LPS (10  $\mu$ g/mL) only or DON plus LPS for four hours. When cells were exposed to LPS alone, the signal intensity of the expression of the protein observed did not change significantly. The treatment of neutrophils with DON at 10  $\mu$ M increased significantly for 40 % in comparison to untreated cells. In contrast, coexposure of DON and LPS caused a marked decrease of phosphorylated NF- $\kappa$ B p65 protein expression in neutrophils. Co-treated neutrophils presented a significant lower expression of the phosphorylated protein compared to untreated cells (Figure 5).

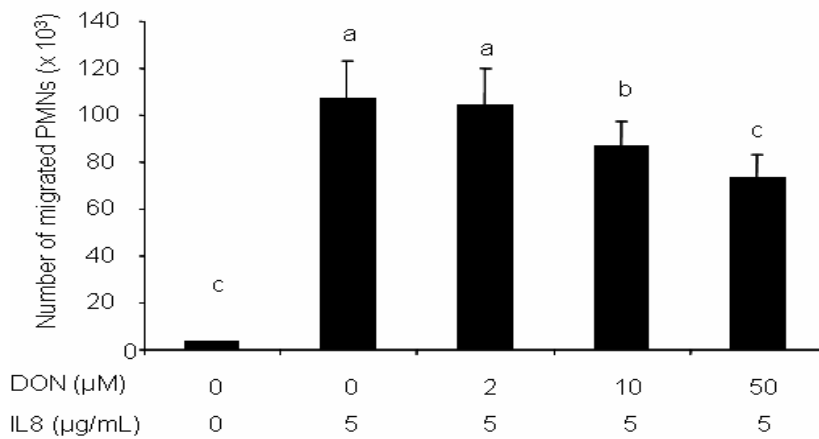


Figure 4: Effect of DON on the migration of PMNs. PMNs were incubated for 1 hour with 0 to 50µM DON, placed in the upper compartment of transwell filter containing IL-8, used as a chemoattractant in the lower compartment. 30 min later the number of migrating PMNs was assessed using the MPO assay. Data are expressed as number of migrated PMNs (mean ± SEM, n=6). Data not sharing the same letter are significantly different (p<0.05).



## **Discussion:**

Numerous studies have demonstrated that trichothecenes can be either immunostimulatory and immunosuppressive in leukocyte function, involving a rapid deregulation of cell signaling and consequent alterations in downstream gene expression (Pestka, 2008). Neutrophils are a subset of phagocytic cells that have a key role in mediating the transition between innate and acquired immune response. Activation of neutrophils by inflammatory stimuli as LPS, induces the release of a variety of proteins that are involved in PMN effectors function, including cytokines (Cassatella, 1995). Among these cytokines, IL-8 is the most abundantly secreted cytokine by neutrophils, and on the other hand a mighty chemoattractant for PMN (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). The results presented herein demonstrated that DON decreases the functional properties of porcine neutrophils and suggest the involvement of transcriptional factor nuclear factor  $\kappa$ B protein (NF- $\kappa$ B) of cells. Based on the cytotoxic assay, the evaluation of the effects of DON on LPS-stimulated porcine neutrophils was conducted with selected concentrations, whereby a maximum level at 50  $\mu$ M of DON showed non-cytotoxic effects after an 8h exposure. Our observations are in agreement with results presented in another *in vitro* study with porcine neutrophils, where a DON treatment did not exhibit cytotoxic effect on porcine neutrophils after an 18h-exposure (Takayama *et al.*, 2005). This amount of DON is representative of doses potentially measured in the serum of pigs after ingestion of the toxin. Indeed, when pigs received for 1 to 2 months feed contaminated with 5700 to 6510  $\mu$ g DON /Kg feed, 21.6 to 43.7 ng DON/mL were detected in their plasma (Goyarts *et al.*, 2005; Goyarts *et al.*, 2006).

To address the influence of DON on porcine neutrophils, IL-8 production by PMNs was analysed during the co-exposure of LPS and non-cytotoxic doses of DON. Exposure to low doses of LPS does not normally cause life-threatening tissue damage, but it can initiate an incomplete and submaximal inflammatory response, in stimulating both mononuclear phagocyte function and production of numerous mediators as proinflammatory cytokine (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6), bioactive lipids and reactive oxygen species (Schletter *et al.*, 1995). In this work, LPS exposure at 10  $\mu$ g/mL stimulated secretion of IL-8 by porcine PMNs. This finding is consistent with numerous studies realised on porcine (Zelnickova *et al.*, 2008) or humans PMNs describing an increased secretion and expression of IL-8 by PMNs upon LPS stimulation (Strieter *et al.*, 1992; Cassatella, 1995).

*In vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that DON could stimulate or repress immune function by modulating a variety of immune mediators production, according to leukocyte (Pestka, 2008).

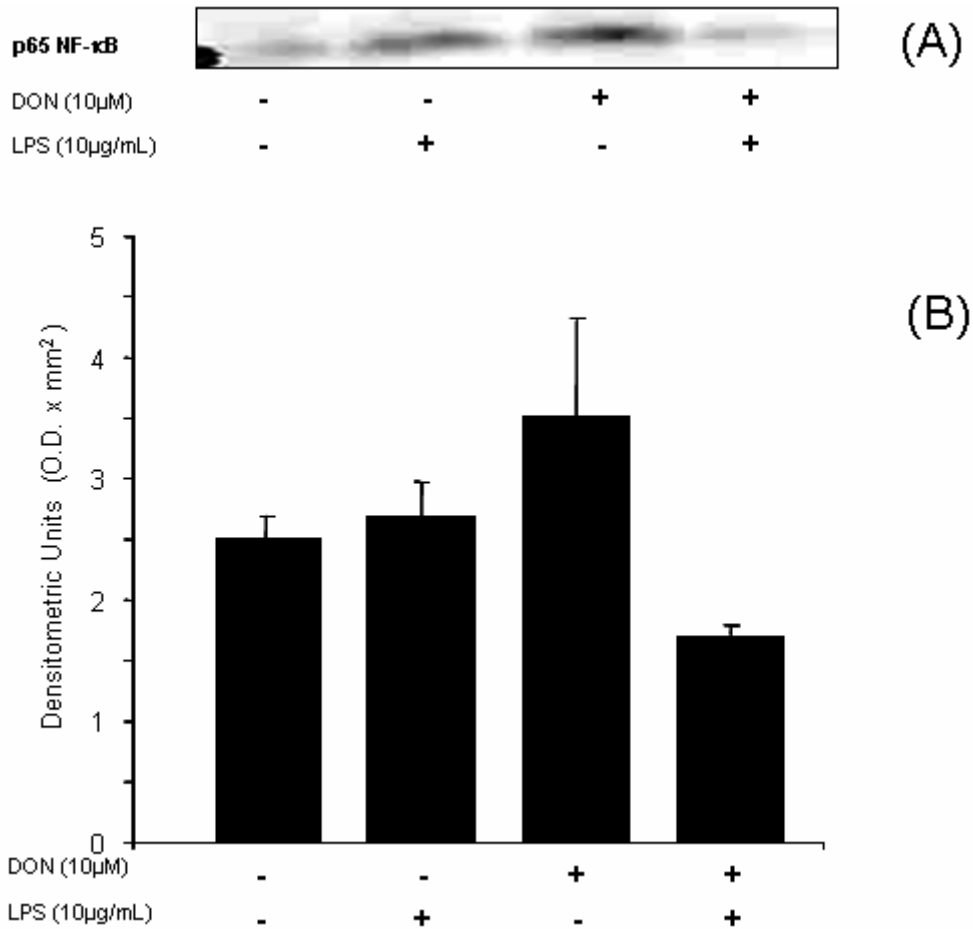


Figure 5: Effect of DON, LPS and their association on the expression of NF- $\kappa$ B p65 subunit. PMNs were seeded in 6-well plate at the density of  $1.10^5$  cell/well, treated for 30 min with 10  $\mu$ M of DON, stimulated with LPS (10 $\mu$ g/mL) and further incubated for 3.5 hours. Cells were then lysed and 10  $\mu$ g of proteins protein were analyzed by immunoblotting with antibodies for phosphorylated NF- $\kappa$ B p65. Panel A represents a representative immunoblots of two repetition and panel B the densitometric analysis (mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments).

In murine and human macrophage cell lines, DON upregulates the secretion and/or the expression of proinflammatory cytokines, cyclooxygenase-2 and chemokines including Macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) and IL-8. Concurrent exposure to LPS greatly magnifies trichothecene-induced cytokine mRNA and protein expression of these mediators (Wong *et al.*, 1998; Sugita-Konishi and Pestka, 2001; Chung *et al.*, 2003; Mbandi and Pestka, 2006). This synergistic effect of co-exposure to DON and LPS was also demonstrated on porcine pulmonary alveolar macrophage (Doll *et al.*, 2009). By contrast, others studies showed that DON (0.01 $\mu$ M to 1 $\mu$ M) associated to LPS exposure (1 $\mu$ g/mL) decreased the production of IL-10 and IL-12 by human and porcine dendritic cells (Hymery *et al.*, 2006; Bimczok *et al.*, 2007). Thus, depending on the type of leukocyte investigated, DON can either increased or inhibit the LPS-induced secretion of cytokines. In the present work, we demonstrated that on porcine PMN, DON inhibits in a dose dependant manner the secretion of IL-8 induced by 10  $\mu$ g/mL LPS. The cell type specific action of mycotoxin on IL-8 has been described with DON but also to other toxins produced by *Fusarium* ssp. For example, Fumonisin B1, selectively decreased the production of IL-8 by porcine intestinal epithelial cells (Bouhet *et al.*, 2006), whereas it increases the IL-8 mRNA expression in the lungs of piglets orally exposed to the toxin (Halloy *et al.*, 2005).

Using flow cytometry, we observed that DON treatment had no effects on the phagocytic activity of PMNs towards FITC-labelled *Escherichia coli*. By contrast, a decrease of the phagocytic activity in response to DON has been observed in macrophages obtained from mice or turkey (Ayrat *et al.*, 1992; Kidd *et al.*, 1995) as well as in monocyte-derived dendritic cells obtained from pigs (Bimczok *et al.*, 2007). Thus, as mentioned above for IL-8 production, DON seems to act differently according to the cell type investigated.

PMNs are able to move toward pathogens or site of inflammation after specific chemoattractants release. In the present work, we demonstrated that *in vitro* exposure of porcine PMNs to 10-50  $\mu$ M DON decreased their chemotaxis upon IL-8 attraction. This may lead to an impaired mobilisation and recruitment of these leukocytes during an infection and thus increase susceptibility to infection (Witko-Sarsat *et al.*, 2000; Zhelev and Alteraifi, 2002). Very few studies have investigated the effect of mycotoxins on PMN chemotaxis. (Takayama *et al.*, 2005) showed that the random migration of porcine neutrophils was not affected by DON-treatment at low doses (0.1 to 10  $\mu$ M). Using formyl-Met-Leu-Phe as chemoattractants, (Richetti *et al.*, 2005) observed an inhibitory effect of ochratoxin B and zearalenone at low concentration (3 nM to 30  $\mu$ M) on the chemotaxis activity of human

neutrophils, and demonstrated that the action of these mycotoxins occurred at the intracellular level and not through an interference with surface receptors to chemoattractants. NF- $\kappa$ B regulates the expression of a wide variety of genes that play critical roles in innate immune response, including IL-8 (Mukaida, 2000; Hoffmann *et al.*, 2002). The phagocytic cell recruitment to the site of infection implicated also NF- $\kappa$ B activation, which induce the transcription of adhesion molecules such  $\beta$ 2-integrins required for migration process of neutrophils (Mizgerd, 2002; Zhelev and Alteraifi, 2002; Kettritz *et al.*, 2004). It was thus of interest to determine the phosphorylation of this nuclear factor in PMN stimulated with LPS and /or treated with DON.

As expected, we observed that LPS exposure induces the phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 subunit. Indeed, in human neutrophils LPS stimulation increases the IL-8 secretion by a NF- $\kappa$ B dependent mechanism (McDonald *et al.*, 1997; Cloutier *et al.*, 2007). We also observed that DON treatment of PMN strongly induces the phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 protein. Such an activation of NF- $\kappa$ B pathway has already been observed in human monocyte (Gray and Pestka, 2007) and human intestinal Caco-2 cells (Van De Walle *et al.*, 2008) upon DON stimulation.

One of the main outcomes of the present study was to demonstrate that co-exposure of PMN to LPS and DON reduces the expression of phosphorylated NF- $\kappa$ B p65 protein. Inasmuch the NF- $\kappa$ B dependent pathway of LPS-induced IL-8 expression, this finding suggest that the dose-dependent decrease observed above after a DON and LPS co-exposure could be related to the inhibition of phosphorylated NF- $\kappa$ B p65 expression. Similar antagonistic effect on LPS stimulation has been reported in human macrophage treated with ochratoxin A (OTA), another mycotoxin. In these experiments, LPS stimulation or OTA-treatment increase the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) through the phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 subunit (Ferrante *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2008). However, when cells were co-exposed to OTA and LPS, the production of NO was reduced (Ferrante *et al.*, 2008). However, results obtained on Caco-2 cells indicate a synergistic action between DON and LPS on the phosphorylation of NF- $\kappa$ B (Van De Walle *et al.*, 2008). Thus, as already mentioned, the effect of DON is different upon the cell type investigated.

Although the decrease of NF- $\kappa$ B p65 expression could explain in part the DON effect of LPS-induced IL-8 secretion, the antagonistic effect observed in this study remain difficult to explain. This phenomenon could be due to the large amount of phosphorylated NF- $\kappa$ B p65 translocation, and induce a large amount of gene expression, including own principal

inhibitors (I $\kappa$ B $\alpha$ ), which in turn decreases the NF- $\kappa$ B activity in feed back inhibitory mechanisms (Liang *et al.*, 2004). Moreover, DON was shown to rapidly induce mitogen-protein activated kinase (MPAK) activation via the ribotoxic stress response (Pestka, 2008), which can interact with the NF- $\kappa$ B activity at both transcriptional and post-transcriptional level in neutrophil (Cloutier *et al.*, 2007). Further investigation should focus on the effect of DON in porcine PMN on the other NF- $\kappa$ B subunit (p50 and p52) and in MPAK activation involved using specific inhibitors to elucidate this mechanism.

PMNs play a major role in host defence and allowed to mount a rapid response to invading microorganism. In the present study, PMNs were stimulated with LPS in order to mimic a bacterial infection. One consequence the decrease IL-8 synthesis and reduced chemotaxis induced by DON exposure could be a reduced recruitment of PMN and others immune cells during an infection, leading to an impaired elimination of the pathogen and an increased susceptibility to infection. DON has been described to modulate the immune function of several different cell types, this study extend this finding to PMNs and suggest that DON effects observed are on the expression of NF- $\kappa$ B p65 protein

### **Acknowledgements**

This work was financially supported by the National program of coordination INRA-AFSSA. Y. Waché was supported by an AFSSA PhD thesis grant.

### **References**

- Almond, G.W. (1996). "Research applications using pigs." *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12(3), 707-16.
- Ayral, A.M., Dubech, N., Le Bars, J. and Escoula, L. (1992). "In vitro effect of diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol on microbicidal activity of murine peritoneal macrophages." *Mycopathologia* 120(2), 121-7.
- Berek, L., Petri, I.B., Mesterhazy, A., Teren, J. and Molnar, J. (2001). "Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro." *Toxicol In Vitro* 15(1), 25-30.
- Bimczok, D., Doll, S., Rau, H., Goyarts, T., Wundrack, N., Naumann, M., Danicke, S. and Rothkotter, H.J. (2007). "The Fusarium toxin deoxynivalenol disrupts phenotype and function of monocyte-derived dendritic cells *in vivo* and *in vitro*." *Immunobiology* 212(8), 655-66.
- Bouhet, S., Hourcade, E., Loiseau, N., Fikry, A., Martinez, S., Roselli, M., Galtier, P., Mengheri, E. and Oswald, I.P. (2004). "The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells." *Toxicol Sci* 77(1), 165-71.

- Bouhet, S., Le Dorze, E., Peres, S., Fairbrother, J.M. and Oswald, I.P. (2006). "Mycotoxin fumonisin B1 selectively down-regulates the basal IL-8 expression in pig intestine: in vivo and in vitro studies." *Food Chem Toxicol* 44(10), 1768-73.
- Boyum, A., Lovhaug, D., Tresland, L. and Nordlie, E.M. (1991). "Separation of leucocytes: improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolality." *Scand J Immunol* 34(6), 697-712.
- Bryden, W.L. (2007). "Mycotoxins in the food chain: human health implications." *Asia Pac J Clin Nutr* 16 Suppl 1, 95-101.
- Cassatella, M.A. (1995). "The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils." *Immunol Today* 16(1), 21-6.
- CAST (2003). Mycotoxins: Risks in plant, Animal, and Human Systems. *Task Force report No. 139*. Ames, Iowa, USA.
- Chung, Y.J., Yang, G.H., Islam, Z. and Pestka, J.J. (2003). "Up-regulation of macrophage inflammatory protein-2 and complement 3A receptor by the trichothecenes deoxynivalenol and satratoxin G." *Toxicology* 186(1-2), 51-65.
- Cloutier, A., Ear, T., Blais-Charron, E., Dubois, C.M. and McDonald, P.P. (2007). "Differential involvement of NF-kappaB and MAP kinase pathways in the generation of inflammatory cytokines by human neutrophils." *J Leukoc Biol* 81(2), 567-77.
- Doll, S., Schrickx, J.A., Danicke, S. and Fink-Gremmels, J. (2009). "Deoxynivalenol-induced cytotoxicity, cytokines and related genes in unstimulated or lipopolysaccharide stimulated primary porcine macrophages." *Toxicol Lett* 184(2), 97-106.
- Eriksen, G.S. and Pettersson, H. (2004). "Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed." *Anim. Feed Sci. Technol.* 114, 205-239.
- Ferrante, M.C., Raso, G.M., Bilancione, M., Esposito, E., Iacono, A. and Meli, R. (2008). "Differential modification of inflammatory enzymes in J774A.1 macrophages by ochratoxin A alone or in combination with lipopolysaccharide." *Toxicol Lett* 181(1), 40-6.
- Goyarts, T., Danicke, S., Rothkotter, H.J., Spilke, J., Tiemann, U. and Schollenberger, M. (2005). "On the effects of a chronic deoxynivalenol intoxication on performance, haematological and serum parameters of pigs when diets are offered either for ad libitum consumption or fed restrictively." *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 52(6), 305-14.
- Goyarts, T., Danicke, S., Tiemann, U. and Rothkotter, H.J. (2006). "Effect of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) on IgA, IgM and IgG concentrations and proliferation of porcine blood lymphocytes." *Toxicol In Vitro* 20(6), 858-67.
- Gray, J.S. and Pestka, J.J. (2007). "Transcriptional regulation of deoxynivalenol-induced IL-8 expression in human monocytes." *Toxicol Sci* 99(2), 502-11.
- Halloy, D.J., Gustin, P.G., Bouhet, S. and Oswald, I.P. (2005). "Oral exposure to culture material extract containing fumonisins predisposes swine to the development of pneumonitis caused by *Pasteurellamultocida*." *Toxicology* 213(1-2), 34-44.
- Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H. and Kracht, M. (2002). "Multiple control of interleukin-8 gene expression." *J Leukoc Biol* 72(5), 847-55.
- Hymery, N., Sibiril, Y. and Parent-Massin, D. (2006). "In vitro effects of trichothecenes on human dendritic cells." *Toxicol In Vitro* 20(6), 899-909.

- Islam, Z., Moon, Y.S., Zhou, H.R., King, L.E., Fraker, P.J. and Pestka, J.J. (2002). "Endotoxin potentiation of trichothecene-induced lymphocyte apoptosis is mediated by up-regulation of glucocorticoids." *Toxicol Appl Pharmacol* 180(1), 43-55.
- Kettritz, R., Choi, M., Rolle, S., Wellner, M. and Luft, F.C. (2004). "Integrins and cytokines activate nuclear transcription factor-kappaB in human neutrophils." *J Biol Chem* 279(4), 2657-65.
- Kidd, M.T., Hagler, W.M., Jr. and Qureshi, M.A. (1995). "Trichothecene mycotoxins depress the mononuclear-phagocytic system of young turkeys." *Immunopharmacol Immunotoxicol* 17(2), 385-98.
- Liang, Y., Zhou, Y. and Shen, P. (2004). "NF-kappaB and its regulation on the immune system." *Cell Mol Immunol* 1(5), 343-50.
- Martins, J.O., Ferracini, M., Ravanelli, N., Landgraf, R.G. and Jancar, S. (2008). "Insulin suppresses LPS-induced iNOS and COX-2 expression and NF-kappaB activation in alveolar macrophages." *Cell Physiol Biochem* 22(1-4), 279-86.
- Mbandi, E. and Pestka, J.J. (2006). "Deoxynivalenol and satratoxin G potentiate proinflammatory cytokine and macrophage inhibitory protein 2 induction by *Listeria* and *Salmonella* in the macrophage." *J Food Prot* 69(6), 1334-9.
- McDonald, P.P., Bald, A. and Cassatella, M.A. (1997). "Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils." *Blood* 89(9), 3421-33.
- Meissonnier, G.M., Laffitte, J., Loiseau, N., Benoit, E., Raymond, I., Pinton, P., Cossalter, A.M., Bertin, G., Oswald, I.P. and Galtier, P. (2007). "Selective impairment of drug-metabolizing enzymes in pig liver during subchronic dietary exposure to aflatoxin B1." *Food Chem Toxicol* 45(11), 2145-54.
- Mizgerd, J.P. (2002). "Molecular mechanisms of neutrophil recruitment elicited by bacteria in the lungs." *Semin Immunol* 14(2), 123-32.
- Mukaida, N. (2000). "Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation." *Int J Hematol* 72(4), 391-8.
- Oswald, I.P., Marin, D.E., Bouhet, S., Pinton, P., Taranu, I. and Accensi, F. (2005). "Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals." *Food Addit Contam* 22(4), 354-60.
- Pestka, J. and Zhou, H.R. (2006). "Toll-like receptor priming sensitizes macrophages to proinflammatory cytokine gene induction by deoxynivalenol and other toxicants." *Toxicol Sci* 92(2), 445-55.
- Pestka, J.J. (2008). "Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis." *Food Addit Contam*, 1-13.
- Pestka, J.J. and Smolinski, A.T. (2005). "Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans." *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 8(1), 39-69.
- Pestka, J.J., Uzarski, R.L. and Islam, Z. (2005). "Induction of apoptosis and cytokine production in the Jurkat human T cells by deoxynivalenol: role of mitogen-activated protein kinases and comparison to other 8-ketotrichothecenes." *Toxicology* 206(2), 207-19.
- Pinton, P., Accensi, F., Beauchamp, E., Cossalter, A.M., Callu, P., Grosjean, F. and Oswald, I.P. (2008). "Ingestion of deoxynivalenol (DON) contaminated feed alters the pig vaccinal immune responses." *Toxicol Lett* 177(3), 215-22.
- Richetti, A., Cavallaro, A., Ainis, T. and Fimiani, V. (2005). "Effect of mycotoxins on some activities of isolated human neutrophils." *Immunopharmacol Immunotoxicol* 27(3), 433-46.
- Roselli, M., Finamore, A., Britti, M.S. and Mengheri, E. (2006). "Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88." *Br J Nutr* 95(6), 1177-84.

- Rothkotter, H.J., Sowa, E. and Pabst, R. (2002). "The pig as a model of developmental immunology." *Hum Exp Toxicol* 21(9-10), 533-6.
- Rotter, B.A., Prelusky, D.B. and Pestka, J.J. (1996). "Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin)." *J Toxicol Environ Health* 48(1), 1-34.
- Scapini, P., Lapinet-Vera, J.A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F. and Cassatella, M.A. (2000). "The neutrophil as a cellular source of chemokines." *Immunol Rev* 177, 195-203.
- Schletter, J., Heine, H., Ulmer, A.J. and Rietschel, E.T. (1995). "Molecular mechanisms of endotoxin activity." *Arch Microbiol* 164(6), 383-9.
- Schothorst, R.C. and van Egmond, H.P. (2004). "Report from SCOOP task 3.2.10 "collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states". Subtask: trichothecenes." *Toxicol Lett* 153(1), 133-43.
- Somersalo, K., Salo, O.P., Bjorksten, F. and Mustakallio, K.K. (1990). "A simplified Boyden chamber assay for neutrophil chemotaxis based on quantitation of myeloperoxidase." *Anal Biochem* 185(2), 238-42.
- Strieter, R.M., Kasahara, K., Allen, R.M., Standiford, T.J., Rolfe, M.W., Becker, F.S., Chensue, S.W. and Kunkel, S.L. (1992). "Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8." *Am J Pathol* 141(2), 397-407.
- Sugita-Konishi, Y., Park, B.J., Kobayashi-Hattori, K., Tanaka, T., Chonan, T., Yoshikawa, K. and Kumagai, S. (2006). "Effect of cooking process on the deoxynivalenol content and its subsequent cytotoxicity in wheat products." *Biosci Biotechnol Biochem* 70(7), 1764-8.
- Sugita-Konishi, Y. and Pestka, J.J. (2001). "Differential upregulation of TNF-alpha, IL-6, and IL-8 production by deoxynivalenol (vomitoxin) and other 8-ketotrichothecenes in a human macrophage model." *J Toxicol Environ Health A* 64(8), 619-36.
- Takayama, H., Shimada, N., Mikami, O. and Murata, H. (2005). "Suppressive effect of deoxynivalenol, a Fusarium mycotoxin, on bovine and porcine neutrophil chemiluminescence: an in vitro study." *J Vet Med Sci* 67(5), 531-3.
- Ueno, Y. (1984). "Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes." *Fundam Appl Toxicol* 4(2 Pt 2), S124-32.
- Van De Walle, J., Romier, B., Larondelle, Y. and Schneider, Y.J. (2008). "Influence of deoxynivalenol on NF-kappaB activation and IL-8 secretion in human intestinal Caco-2 cells." *Toxicol Lett* 177(3), 205-14.
- Waché, Y.J., Haddioui, L., Belkhef, H., Roques, C. and Oswald, I.P. (submitted). "The mycotoxin, Deoxynivalenol, inhibits the cell surface expression of activation markers in human macrophages." *Mol. Nutr. Food Res.*
- Warner, R.L., Brooks, K. and Pestka, J.J. (1994). "In vitro effects of vomitoxin (deoxynivalenol) on T-cell interleukin production and IgA secretion." *Food Chem Toxicol* 32(7), 617-25.
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P. and Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). "Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects." *Lab Invest* 80(5), 617-53.
- Wong, S.S., Zhou, H.R., Marin-Martinez, M.L., Brooks, K. and Pestka, J.J. (1998). "Modulation of IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha secretion and mRNA expression by the trichothecene vomitoxin in the RAW 264.7 murine macrophage cell line." *Food Chem Toxicol* 36(5), 409-19.
- Zelnickova, P., Leva, L., Stepanova, H., Kovaru, F. and Faldyna, M. (2008). "Age-dependent changes of proinflammatory cytokine production by porcine peripheral blood phagocytes." *Vet Immunol Immunopathol* 124(3-4), 367-78.



Zhelev, D.V. and Alteraifi, A. (2002). "Signaling in the motility responses of the human neutrophil." *Ann Biomed Eng* 30(3), 356-70.

Zhou, H.R., Islam, Z. and Pestka, J.J. (2005). "Induction of competing apoptotic and survival signaling pathways in the macrophage by the ribotoxic trichothecene deoxynivalenol." *Toxicol Sci* 87(1), 113-22.

**CHAPITRE II :**

**EFFETS DU DON SUR LA FLORE INTESTINALE ET LE PORTAGE  
ASYMPTOMATIQUE DES SALMONELLES CHEZ LE PORC : ÉTUDE *IN*  
*VIVO.***

## CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Un des problèmes majeurs pour tous les opérateurs de la filière porcine reste aujourd'hui la réduction de la contamination des animaux et de leurs produits par des bactéries pathogènes et/ou zoonotiques. Les facteurs qui interviennent dans le développement de ces infections sont multiples, et pas toujours bien connus, mais parmi eux, l'alimentation et les conditions d'hygiène sont certainement des éléments fondamentaux. La qualité de l'aliment est en grande partie liée à la qualité des matières premières entrant dans sa composition. A ce titre, les mycotoxines comme d'autres composés toxiques, qui sont très peu dégradés au cours des différents procédés de fabrication, méritent une attention particulière.

La présence de mycotoxine telle le DON dans les aliments n'est pas rare, et le système digestif des animaux reste une première cible pour cette toxine. Chez le porc, la consommation d'aliment contaminé en DON peut altérer la membrane épithéliale du tractus digestif (Cote *et al.*, 1985), et plus particulièrement au niveau de l'iléon, site majeur d'absorption de la toxine (Rotter *et al.*, 1996; Eriksen *et al.*, 2003). Une étude récente a montré que le DON diminuait l'expression de protéines de jonction de l'épithélium intestinal de l'iléon et favorisait la translocation d'*E. coli* à travers la barrière intestinale (Pinton *et al.*, 2007). En revanche, les effets du DON sur la flore intestinale ont été très peu étudiés, alors que l'équilibre de la flore intestinale est reconnu pour être un facteur important de la santé animale et plus particulièrement de la résistance aux infections par les entéropathogènes (Hopwood *et al.*, 2002; Pluske *et al.*, 2007). Chez le porc, seules des études *in vitro* ont permis d'identifier certaines bactéries intestinales responsables de la détoxification du DON (Kollarzik *et al.*, 1994; Eriksen *et al.*, 2002). Une augmentation de la flore anaérobie intestinale cultivable a été mise en évidence avec un autre trichothécène, la toxine T-2 (Tenk *et al.*, 1982). Par contre, les effets du DON sur la microflore intestinale n'ont jamais été rapportés.

Dans les pays industrialisés, *Salmonella enterica* représente le principal agent pathogène de contamination des produits agroalimentaires destinés à la consommation humaine. Les salmonelles possèdent des sérovars ubiquistes, tels Choleraesuis, Derby, Typhisuis ou Typhimurium, différenciés selon leurs antigènes somatiques et flagellaires, leur permettant de contaminer indifféremment les espèces animales et humaines (Uzzau *et al.*, 2000). Certains sérotypes peuvent provoquer une infection sévère chez une ou plusieurs espèces animales, mais la grande majorité n'entraîne qu'une colonisation des voies digestives des animaux; on

parle ainsi de portage asymptomatique (Boyen *et al.*, 2008). A titre d'exemple, des études épidémiologiques effectués aux Etats-Unis ont montré que 1,4% à 22% des exploitations porcines comptaient des animaux positifs en salmonelles, suivant le type d'élevage, sans qu'aucun symptôme infectieux ne soit déclaré (Davies *et al.*, 1998; Barber *et al.*, 2002; Rodriguez *et al.*, 2006). En Europe, la présence de *Salmonella* Typhimurium est la première cause de toxi-infection alimentaire et il a été estimé qu'entre 15 et 23% des cas des salmonelloses humaines avaient pour origine la viande de porc (Boyen *et al.*, 2008).

Certaines mycotoxines ont été incriminées comme agents aggravants des troubles digestifs et par voie de conséquence d'infection des animaux. Mais jusqu'ici, les informations sur la combinaison des deux infections sont peu nombreuses et restent contradictoires suivant l'espèce animale et la mycotoxine étudiée. Hara-Kudo *et al.*, 1995) ont montré que l'administration orale à des souris BALB/c de 2 mg/kg PV de DON, 2 semaines avant une inoculation de *Salmonella enteridis* favorisait la multiplication de la bactérie dans les ganglions mésentériques et le foie des animaux. Par contre, aucune différence sur la prolifération de *Salmonella* Typhimurium n'a été observée chez ces mêmes animaux exposés à un autre trichothécène, la toxine T-2 à 2 mg/kg PV (Ziprin *et al.*, 1987) alors que selon d'autres études (Tai et Pestka, 1988; Vidal et Mavet, 1989), cette mycotoxine a engendré une augmentation de la réponse immunitaire et de la mortalité chez des souris infectées par *Salmonella* Typhimurium. De même, l'administration d'un aliment contaminé par de l'ochratoxine A (3 ppm) peut augmenter la susceptibilité des poulets à une colonisation du tractus digestif par *Salmonella* Typhimurium (Fukata *et al.*, 1996), et diminuer les défenses immunitaires et la réponse vaccinale des porcs en croissance infectés par *Salmonella* Choleraesuis (Stoev *et al.*, 2000). D'après un travail réalisé dans notre équipe à l'AFSSA de Ploufragan (Tanguy *et al.*, 2006), l'exposition chronique des porcs à un aliment contaminé avec la fumonisine B1 à une dose de 8,5 ppm n'a pas eu d'effet sur l'excrétion et la durée de portage de *Salmonella* Typhimurium par les porcs en phase de croissance.

L'alimentation ou la présence de troubles digestifs étant susceptible d'influencer la persistance des salmonelles chez les animaux (Fravalo *et al.*, 2002; Mikkelsen *et al.*, 2004), l'effet du DON sur la flore digestive et la sensibilité à l'infection aux salmonelles des animaux reste à explorer. Ainsi, le premier objectif de cette seconde partie de thèse a été d'évaluer l'impact d'une absorption chronique d'un aliment naturellement contaminé en DON, à la fois sur la flore intestinale cultivable de porcelets en croissance par comptage des bactéries anaérobies sulfite-réductrices (ASR) et de la flore aérobie mésophile (FAM), et sur l'équilibre de la flore bactérienne totale (cultivable et non cultivable), par une technique de

biologie moléculaire CE-SSCP (Capillary Electrophoresis Single-Stranded Conformation Polymorphism). Les effets de cette alimentation ont ensuite été explorés sur la sensibilité des animaux à un agent pathogène zoonotique, *Salmonella enterica* Typhimurium, en portage asymptomatique. Nous avons mesuré ces effets à travers l'appréciation du statut général clinique des animaux et la mesure de leurs performances zootechniques, ainsi que sur des indicateurs bactériologiques (coliformes thermotolérants, *Salmonella* spp.) et sérologiques (IgA, séroconversion).

## 1. Impact du DON sur la flore intestinale des porcs

Dans le but d'évaluer l'impact d'une alimentation naturellement contaminée en DON (2,7 ppm) sur la flore intestinale des porcs, une étude comparative a été réalisée sur 24 porcelets de 9 semaines d'âge, nourris pendant 4 semaines avec, pour moitié, un aliment exempt de mycotoxine et pour l'autre moitié, un aliment contaminé.

Aucun signe clinique ni pathologie n'ont été observés chez les animaux recevant un régime contaminé. La première semaine suivant la distribution de l'aliment contaminé, une réduction significative du gain de poids et de la consommation alimentaire a été observée chez les porcelets recevant l'aliment contaminé comparés aux porcelets recevant l'aliment témoin. Après 5 semaines de distribution d'aliment contaminé, les performances de croissance étaient identiques dans les deux lots. Aucun effet véritable du DON sur la population microbienne cultivable n'a pu être observé par les méthodes de bactériologie classique. En revanche, l'analyse des profils de flore par CE-SSCP a permis de mettre en évidence des différences de profils de flore bactérienne intestinale entre les porcs recevant un aliment contaminé et les porcs nourris avec l'aliment témoin dans la période de deux à quatre semaines suivant le début de la distribution de l'aliment contaminé.

D'après les résultats de cette étude, il apparaît donc que les nouvelles techniques de biologie moléculaire permettent de mettre en évidence des modifications de profils de flore intestinale, qui n'apparaissent pas avec les méthodes culturales. Au-delà de l'intérêt suscité par les résultats de ces techniques de biologie moléculaire, ces éléments laissent à penser que cette toxine a de réels effets sur l'équilibre de la flore intestinale.

**Ce travail a fait l'objet d'un article scientifique, publié dans le journal « International Journal of Molecular science », paru en 2009 (cf : page 3 de la thèse).**

Article

## Impact of Deoxynivalenol on the Intestinal Microflora of Pigs

Yann J. Waché<sup>1,2</sup>, Charlotte Valat<sup>1\*</sup>, Gilbert Postollec<sup>1</sup>, Stephanie Bougeard<sup>1</sup>,  
Christine Burel<sup>1</sup>, Isabelle P. Oswald<sup>2</sup> and Philippe Fravallo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> French Agency for Food Safety (AFSSA) – Zoopôle des côtes d’Armor, BP53, 22440 Ploufragan – France. E-Mails: y.wache@ploufragan.afssa.fr (Y. W.); g.postollec@ploufragan.afssa.fr (G. P.); s.bougeard@ploufragan.afssa.fr (S. B.); c.burel@ploufragan.afssa.fr (C.B.); p.fravallo@ploufragan.afssa.fr (P. F.)

<sup>2</sup> French Institute of Agricultural Research (INRA) – UR 66- Unité de Pharmacologie-Toxicologie, 180 chemin de Tournefeuille, 31027 Toulouse cedex 3 – France.  
E-Mail: isabelle.oswald@toulouse.inra.fr

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: c.valat@ploufragan.afssa.fr;  
Tel. 33 (0)2 96 01 62 39; Fax: 33 (0)2 96 01 62 23

Received: 6 November 2008; in revised form: 22 December 2008 / Accepted: 24 December 2008 /  
Published: 27 December 2008

---

**Abstract:** Deoxynivalenol (DON), a mycotoxin produced by some *Fusarium* species, is a frequent contaminant of cereal. In the present study, 24 weanling piglets received either control feed or feed naturally contaminated with DON (2.8 mg/kg) for four weeks. Consumption of contaminated feed significantly reduced the animal weight gain during the first week of the experiment, but had a moderate effect on cultivable bacteria in the pig intestine. By contrast, changes in the intestinal microflora were observed by Capillary Electrophoresis Single-Stranded Conformation Polymorphism (CE-SSCP) in DON-exposed animals, suggesting an impact of this toxin on the dynamics of intestinal bacteria communities.

**Keywords:** Mycotoxin, Deoxynivalenol, pigs, intestinal microflora, growth performance, faeces, anaerobic sulfite-reducing bacteria, CE-SSCP.

---

## 1. Introduction

Mycotoxins are fungal secondary metabolites, potentially hazardous to human and animal health following consumption of contaminated food or feed. Contamination of cereals with mycotoxin is a worldwide problem leading to important economic losses for the agricultural industry [1]. The toxicological syndromes caused by ingestion of mycotoxins range from sudden death to reproductive disorders and growth impairment. Consumption of fungal toxins may also decrease resistance to infectious diseases [1, 2].

Deoxynivalenol (DON), also known as vomitoxin, is a mycotoxin of the trichothecene family that is mainly produced by *Fusarium* spp. DON is commonly detected in cereals, particularly in wheat, barley, maize, and their by-products. It is the most prevalent trichothecene contaminant in crop production in Europe and North America [3]. This toxin is resistant to milling, processing and heating, and, therefore, readily enters the human and animal food chains [4]. DON exhibits toxic effects in humans as well as in all animal species investigated to date [5, 6]. Among animal species, pigs show a relative high sensitivity to DON, and, because of the high percentage of wheat in pig diets, swine could be at a greater risk of exposure to this toxin. In swine, the initial adverse effect observed after DON exposure is reduced feed intake. Growth (anorexia and decreased nutritional efficiency), immune function (enhancement and suppression), and reproductive performances (reduced litter size) are also adversely affected by DON [7].

The intestine is the major site of DON absorption [5]. In the pig, DON is rapidly and efficiently absorbed, most probably in the upper part of the small intestine, and is mainly excreted in the urine, with no accumulation in tissues [8, 9]. Consumption of DON-contaminated feed in pigs impacts the gastrointestinal tract, causing epithelial injuries of the stomach and the intestine, leading to intestinal inflammatory response [5, 10, 11]. *In vitro* and *in vivo* studies have also demonstrated that DON inhibits intestinal nutrient absorption [12-14], alters intestinal cell functions [15, 16], and compromises the intestinal barrier function [16, 17].

By contrast, the effect of DON on the intestinal microflora has been poorly investigated. *In vitro* studies have identified intestinal bacterial strains that promote metabolism, binding or detoxification of DON [18-22]. Direct impact of DON on intestinal microflora composition has never been reported and only few data are available for other members of the trichothecene toxin group. Feeding pigs with the T-2 toxin resulted in a substantial increase of aerobic bacterial counts in the intestine [23]. By contrast, feeding pigs with fumonisin was not reported to induce any modification of *Salmonella* counts in the ileum, caecum and colon in an asymptomatic carriage pig model [24] and bacterial growth of species representative of the human intestinal flora was not affected by this mycotoxin [25].

Stability of the intestinal flora appeared to be an important factor for animal health [26, 27]. The aim of the present study was to characterize the effect of chronic exposure due to consumption of naturally DON-contaminated diet on the stabilized intestinal microflora of pigs. The DON effect was assessed by bacterial counting of aerobic and anaerobic cultivable-indicators, relevant for pig health status studies. The dynamic of the total bacterial community was investigated by molecular technique (Capillary Electrophoresis Single Stranded Conformation Polymorphism, CE-SSCP) in order to investigate culture-independent bacterial populations.



## 2. Results

### 2.1. Zootechnical performance

A significant reduction of daily weight gain was observed in piglets exposed to the contaminated diet when compared to animals receiving the control diet (Table 1). This effect was transient and no differences in the daily weight gain of animals feed with control or contaminated diet was observed during the second, third and the fourth week of the experiment (Table 1). During the entire experimental period, no animal manifested diarrheic episodes, vomiting or hypothermia symptoms.

**Table 1.** Growth parameters of pigs during the experimental period.

Parameters	Experimental Group	Experimental period (in days, d)				
		d-7 to d0 <sup>(1)</sup>	d0 to d7	d7 to d14	d14 to d21	d21 to d28
Daily Weight Gain	Control	0.93 ± 0.05 <sup>(2)</sup>	0.96 ± 0.04	1.02 ± 0.04	1.15 ± 0.07	1.00 ± 0.12
	DON	0.85 ± 0.04	0.42 ± 0.06 ***	0.96 ± 0.06	1.00 ± 0.07	1.07 ± 0.06
Feed intake	Control	1.67 ± 0.05 <sup>(3)</sup>	2.09 ± 0.09	2.59 ± 0.04	2.85 ± 0.01	3.05 ± 0.04
	DON	1.55 ± 0.04	1.12 ± 0.02	2.77 ± 0.12	2.86 ± 0.01	2.78 ± 0.06
Feed conversion ratio	Control	1.79 ± 0.07 <sup>(4)</sup>	2.18 ± 0.07	2.54 ± 0.09	2.47 ± 0.02	3.06 ± 0.58
	DON	1.84 ± 0.02	2.68 ± 0.46	2.87 ± 0.11	2.88 ± 0.37	2.60 ± 0.07

<sup>(1)</sup> Before DON exposure; <sup>(2)</sup> Data are mean ± SE of twelve (d-7 to d0), or six (others periods) pigs per group; <sup>(3)</sup> Data are mean ± SE of consumption per animal per day, calculated on the basis of collected values in two pens per group (n=2); <sup>(4)</sup> Data are mean ± SE, calculated for the period on the basis of collected values in two pens per group; DON-treated and control animals were compared by Student t test: \*\*\* indicates statistically significant differences,  $P < 0.001$ .

### 2.2. Bacteriological analysis

Faecal samples collected on days 0, 7, 14 and 28, from animals receiving either the DON-contaminated or the control diet and stored frozen were analysed by classical bacteriological analysis. The effect of DON was first investigated by measuring total faecal Aerobic Mesophilic Bacteria (AMB) and Anaerobic Sulfite-Reducing (ASR) bacterial counts representing the dominant cultivable bacterial population. The analysis was completed with a molecular-based method, by comparing the CE-SSCP patterns from dominant population analysis of the individual intestinal flora.

We verified that freezing only had a minor effect on the bacterial count. Indeed, the bacterial load before and after freezing decreased by 0.45 to 1.08 log CFU/g for ASR and by 0.18 to 1.28 log CFU/g for AMB. Thus, the decrease was lower than 1.5 log CFU/g for both bacterial groups.

Total AMB and ASR bacteria were used as an indicator of aerobic, facultative anaerobic and anaerobic flora. Data reported in Table 2 indicated that the number of bacteria (AMB and ASR) in the faecal samples slightly evolved during the experimental period. The number of AMB was significantly

increased during the first week of the experiment, reached a plateau (days 7 to 14) and then decreased only in samples from animals receiving the control diet. The concentration of ASR in faeces was stable during the first two weeks of the experimental period and decreased in both groups (control and contaminated diets) at the last sampling date (day 28). At the end of the trial, AMB concentrations were slightly but significantly higher in pigs fed the DON-contaminated diet than in the control group (Table 2).

**Table 2.** Evolution of bacteria counts in faeces from pigs during the experimental period.

Bacteria	Experimental group	Sampling days (d)			
		d0 <sup>(1)</sup>	d7	d14	d28
Aerobic Mesophilic Bacteria (AMB)	Control	5.24 ± 0.25 <sup>a</sup>	7.68 ± 0.22 <sup>b</sup>	7.37 ± 0.13 <sup>b</sup>	6.53 ± 0.14 <sup>c</sup>
	DON	5.27 ± 0.08 <sup>a</sup>	7.37 ± 0.32 <sup>b</sup>	7.71 ± 0.35 <sup>b</sup>	7.22 ± 0.10 <sup>b</sup>
Anaerobic Sulfite-Reducing bacteria (ASR)	Control	9.52 ± 0.05 <sup>a</sup>	9.31 ± 0.15 <sup>a</sup>	9.02 ± 0.17 <sup>a</sup>	7.83 ± 0.16 <sup>b</sup>
	DON	9.05 ± 0.39 <sup>a</sup>	8.66 ± 0.38 <sup>a</sup>	8.45 ± 0.22 <sup>a</sup>	7.27 ± 0.09 <sup>b</sup>

Results are expressed as log (Colony Forming Unit /g faeces), mean ± SE (n=6 individual samples); <sup>a-c</sup> Data not sharing a common letter within the same bacterial group are significantly different (p<0.05), compared with contrast associated with the linear mixed model, p< 0.05; <sup>(1)</sup> before DON exposure.

A molecular analyse was also performed to determine the effect of the DON contaminated diet on faecal microflora balance. The dynamic of the bacterial communities was evaluated by means of several parameters such as the dominance and the richness indexes from CE-SSCP profiles. The dominance index (S), referring to the diversity, was conserved throughout the experiment in both control and DON-exposed groups (Table 3). In the control group, the richness index (R), based on the peak numbers, decreased significantly at day 14 and was lower in the control group when compared to the DON-exposed group (Table 4).

To calculate the similarity between communities, fingerprints are usually analysed by cluster analysis, e.g., unweighted pair-group method based on arithmetic means [28], or by Principal Component Analysis (PCA) statistical analysis. In the present study, cluster analysis and PCA were not performed because samples from each animal taken at different times were considered as dependent data and the number of independent data (different animal) was too small to provide a robust cluster or PCA analysis. The distances between bacterial communities for animals fed control or contaminated diets were investigated by comparing the peak area for all samples according to contrast analysis associated with the linear mixed models.

Based on two repetitions for each sample, the statistical analysis with the linear mixed model did not show any significant differences between samples. In CE-SSCP profiles, among all observed peaks, 3 peaks showing a significant treatment by time interaction were identified according to the linear mixed model (Figure 1; Peak 23, p = 0.024; Peak 26, p = 0.015; Peak 32, p = 0.004).

**Table 3.** Dominance and richness indexes from CE-SSCP patterns.

Index <sup>(2)</sup>	Experimental group	Sampling days (d)			
		d0 <sup>(1)</sup>	d7	d14	d28
Dominance (S)	Control	0.93 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.92 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.94 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.93 ± 0.02 <sup>a</sup>
	DON	0.92 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.93 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.94 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.01 <sup>a</sup>
Richness (R)	Control	0.86 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.02 <sup>b</sup> *	0.84 ± 0.04 <sup>a</sup>
	DON	0.84 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.80 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.87 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.03 <sup>a</sup>

*Note:* Results are expressed as mean ± SE (n=6 individual samples). <sup>(1)</sup> Before DON exposure. <sup>(2)</sup> Dominance index (S: Simpson index); Richness index (R). <sup>a-b</sup> Data not sharing a common letter within the same row group are significantly different (p<0.05). DON treated and control groups were compared with contrast associated with linear mixed model the linear mixed model; \*, P<0.05.

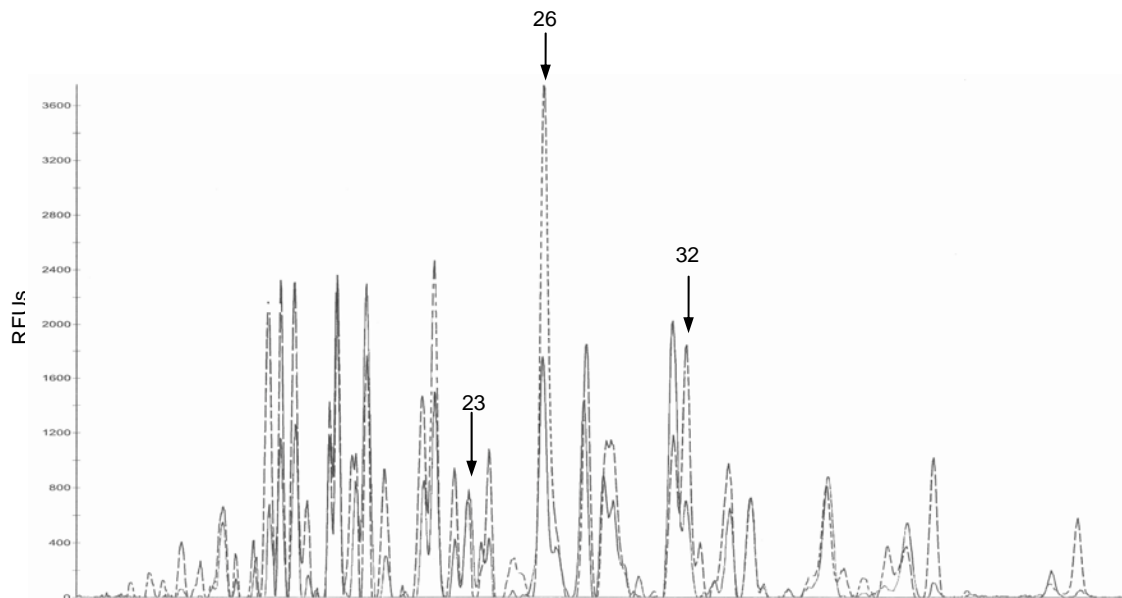
**Table 4.** Effect of time and diet on the area of selected peaks obtained from CE-SSCP profile analysis.

Peak	Experimental group	Sampling days (d)			
		d0 <sup>(1)</sup>	d7	d14	d28
P23	Control	3.56 ± 0.99 <sup>a,c</sup>	3.43 ± 2.28 <sup>a,b</sup>	1.20 ± 0.46 <sup>b</sup> *	5.12 ± 1.52 <sup>c</sup>
	DON	1.65 ± 0.32 <sup>a</sup>	3.96 ± 1.12 <sup>b</sup>	6.26 ± 1.41 <sup>b</sup>	5.80 ± 1.29 <sup>b</sup>
P26	Control	30.80 ± 9.21 <sup>a</sup>	35.34 ± 4.83 <sup>a</sup>	7.33 ± 2.65 <sup>b</sup>	27.44 ± 6.20 <sup>a</sup> *
	DON	21.21 ± 5.28 <sup>a,b</sup>	26.27 ± 4.05 <sup>a</sup>	2.60 ± 0.49 <sup>b</sup>	10.90 ± 2.71 <sup>c</sup>
P32	Control	17.18 ± 4.43 <sup>a</sup>	19.38 ± 2.14 <sup>a</sup>	4.27 ± 2.55 <sup>b</sup>	16.28 ± 3.78 <sup>a</sup> **
	DON	11.43 ± 2.62 <sup>a</sup>	15.12 ± 2.35 <sup>a</sup>	8.35 ± 2.67 <sup>a</sup>	5.21 ± 1.86 <sup>a</sup>

*Note:* Results are expressed as mean arbitrary units ± SE (n=6). <sup>(1)</sup> Before DON exposure. <sup>a-c</sup> Data not sharing a common letter within the same row are significantly different (p<0.05). For each peak and at each day, values were obtained for control and DON-treated animals compared with contrast associated with the linear mixed model: \*: p<0.05; \*\* p< 0.01.

According to these peaks, the days showing a significant difference of the peak area between animals feed control and DON-contaminated diets were then determined (Table 4). At day 14, the area of peak 23 was 5.2 fold higher (p<0.05) for control animals compared to that of DON-exposed animals. At day 28, the areas of peaks 26 and 32 were lower for control animals compared with those of DON-exposed animals (2.5 fold, p<0.01 and 3.1 fold, p<0.01, respectively).

**Figure 1.** CE-SSCP profiles of faeces from control animals (dotted line) or from DON-exposed animals (continued line) group at day 28. Both profiles were obtained after normalisation with the GeneMapper software (Applied Biosystems, Foster City, USA) and standardisation (aligning). Indicated peaks are those whose area is significantly modified during the whole of the experiment according to contrast analysis associated with the linear mixed model ( $p < 0.05$ ). RFUs, Relative Fluorescence Units.



### 3. Discussion

The main purpose of this study was to evaluate the effect of a diet naturally contaminated with DON on the intestinal microflora of the pig. Indeed, the intestinal microflora is very important because there are close links between the host and its intestinal microflora especially through the immune response and via the metabolic products of fermentation processes. Thus an impaired balance of the intestinal flora could have many adverse effects on the health of the host [29].

One of the challenges of the experimental design was to find raw materials naturally contaminated with DON and not contaminated by other toxins from *Fusarium*. The experimental diet presented a level of DON of 2.8 mg per kg, with low levels of other mycotoxins. This DON contamination level is comparable with that used in other studies [16, 30, 31] and is in accordance with the higher levels currently found in feed manufactured with usual feed constituents.

The main effect of DON ingestion, especially in pigs, is a decrease of both feed intake and weight gains [6, 7]. These effects are observed for contamination level above 1 mg/kg feed and are dependent on the age of animals and the feeding period [7]. In the present study, feeding pigs with a diet naturally contaminated with DON (2.7 mg/kg) had a transient negative effect on the daily weight gain of the animals. A reduced feed consumption was also observed, however, as the feed consumption could only be measured at the pen levels (two pens per diet) and the effect of DON was not statistically significant. These results are in agreement with other studies, showing a transient effect of DON on feed intake in pigs [32, 33]. However, other experiments using DON levels above 3 mg/kg feed, have shown a persistence, for up to eight weeks, of the DON effect on growth parameters [10, 34]. Our

results confirmed that DON has an impact on zootechnical parameters in pigs without clinical signs of disease and that DON-contamination could have a more deleterious effect on growth performances than a moderate feed restriction.

More recently, several studies have investigated the interaction between some intestinal microflora strains and mycotoxins, such as Trichothecene, in *in vitro* experiments [18-20, 22, 35]. These studies aim to identify bacterial strains that could reduce the toxicological effects of mycotoxins. To our knowledge, few studies have investigated the effect of Trichothecene on the intestinal microflora [23]. After administration of T-2 toxin at a dose of 5 mg/kg, an increase in bacterial counts in the gut of rat and pigs, especially of Coliform bacteria, has been observed. The authors related this modification to a change in the host's natural resistance of the intestinal content [23].

In the present study, although a slight but statistically significant, effect of DON, being lower than 1 log CFU/g, was observed on AMB concentration at day 28, no significant effect of DON could be observed using the culture-dependent method on the ASR concentration mainly represented by the *Clostridium* group, representing the dominant cultivable intestinal bacterial population [36]. Nevertheless, changes in AMB and ASR counts in faeces of pigs were observed in relation to the age of the pigs, may correspond to the adaptation to experimental diet [37]. Indeed, the percentage of wheat in the diet was progressively increased before experimental diet introduction. Comparison with intestinal bacterial counts performed in other studies [38, 39] is difficult because of the variability between experimental designs. Moreover, we should be keep in mind that estimates of culturability of bacteria in the gastrointestinal tract vary from 10 to 50% [40] and classical bacteriological counts cannot illustrate the changes in individual species abundance of the microbial community.

Based on the electrophoretic separation of single stranded DNA fragments according to size and secondary structure, the CE-SSCP technique provides fingerprints of a complex microbial community [41, 42]. This method was used in order to assess the potential changes of bacterial community in animals fed either control or DON-contaminated diets. These changes were observed by calculating the dominance index, reflecting the diversity (Simpson index, S) and the richness (R) index, according to the peak area and the number of peaks, respectively. No effect of DON on the diversity degree was observed. The diversity is conserved from day 0 to day 28, corresponding to 9 to 13 week-old pigs, in both control and DON-exposed groups. These results are in accordance with previous reports showing that the normal adult flora is developed and becomes stable and characteristic for each animal after 4 to 6 weeks post weaning [43, 44]. By contrast, the richness index evolved during the experiment, being lower in the control group than in the DON-exposed group at day 14. However, this difference seems to be related more to the decrease of the R index in the control group than to a potential effect of DON.

The CE-SSCP is able to show changes in total intestinal microflora, although a common criticism of community fingerprinting techniques is the potential for artifacts. The number of peaks allows an estimation of the species richness, although in a complex matrix it may only represent the dominant populations. In theory, one bacterial species is represented by one peak. However, because of intraspecies operon heterogeneity or potential multiple conformation of the same sequence, it has been observed that one organism may yield more than one band or peak [45, 46]. The extraction and the number of PCR products can be biased to specific groups [47] or overestimated because of multiple rDNA copies per genome [48]. In addition, when more than 35 peaks are present, the number of peaks does not directly correlate with the degree of diversity [49].

Despite the high variability between individual animals and the lack of significant changes due to the effect of DON on the diversity of the bacterial community, the statistic linear mixed model developed in this study allowed the identification of specific peaks, which presented significant area variations, representing specific changes in CE-SSCP patterns. To our knowledge, this is the first time that an impact of DON on the intestinal microflora has been demonstrated. Thus, as this effect could have consequences for the pig health status, further investigations would be interesting. Although the most important changes in microflora are usually observed just after the weaning when the most digestive problems occur, the variability of intestinal microflora is very high during this period. As the high variability could have masked some changes, as a consequence this first study was performed on 9-week-old pigs when the microflora is stabilised [43, 44] and when the diet formulation is constant. Further studies on the influence of DON on young animals could be relevant.

The microflora in the ileum is distinct in composition from that in the caecum, colon or faeces [50], knowledge of the effect of mycotoxin on microbial intestinal flora being limited. Only faecal samples were analysed in this explorative study. The results of this first study clearly demonstrate that low doses of DON which could be usually find in livestock animals feedstuff had an impact on the faecal flora. Considering the faecal flora, these original findings are very interesting because it hypothesized that low doses of DON could modify the gastrointestinal associated microflora. Future studies on the impact of DON on different parts of the gastrointestinal tract, especially the ileum where most DON is absorbed [8, 9] and the large intestine where DON is metabolised [9], will help to better define the impact of DON of intestinal microflora. Other doses of mycotoxin could be tested in order to evaluate the impact of the acute toxicity of mycotoxin on pig microflora.

The statistical model developed in the present study could be of interest to identify slight changes, which cannot be identified by classical statistical analysis. However, further investigations are needed to identify and sequence the genome of the bacterial communities corresponding to the selected peaks. To identify peaks of CE-SSCP runs, the microbial community PCR products have to be analysed in parallel with PCR products obtained from a clone library of the selected sample, and the average and standard deviation of the relative migration distance of all peaks could be determined. CE-SSCP is a promising high-throughput tool for profiling complex communities [51]. Despite the extensive use of CE-SSCP, the assignation of peaks remains fastidious and not always possible in particular in a complex matrix. Other fingerprint methods on gels (SSCP, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis DGGE) or by chromatography (Denaturing High Performance Liquid Chromatography DHPLC) allow the assignation of bands or peaks by sequencing directly from the gel or eluted samples. Nevertheless, due to artefacts, the identification of unique species by band or peak is infrequent in a complex matrix. It would also be interesting to ascertain if these changes in the intestinal microflora are dependent on the dose of DON ingested and if they would persist when pigs return to a mycotoxin-free diet.

## **4. Experimental Section**

### *4.1. Animals, housing and experimental design*

Animals were used in the accordance with Guidelines National Institutes of Health Guide and the French Ministry of Agriculture for the care and use of laboratory animals. The study was carried out

with twenty-four 9-week-old specific pathogen-free Large White pigs, born at the AFSSA experimental farm at Ploufragan, France. After weaning at four weeks of age, animals were individually identified and divided into two groups (6 females and 6 castrated males per group), with a mean initial live weight of  $30.0 \pm 2.1$  kg and  $29.6 \pm 1.6$  kg respectively. At nine weeks of age, pigs were fed with the control or the experimentally contaminated diet, which constituted the day 0 of the trial. Each group, divided into two pens of six animals, was housed in a separate block of the housing unit with free access to feed and water. Pigs were randomly distributed within pens in order to avoid the effect of the pen and of the lineage. Pigs were examined daily for body temperature and faeces aspect. No morbidity or mortality was recorded during the study. Room temperature and air velocity were automatically controlled, and pens were daily cleaned. Feed refusals were weighed and discarded. In each group, six pigs (three per pens) were sacrificed at day 7; the other six animals were sacrificed at the end of the experiment (at day 28).

#### 4.2. Experimental diet

Pigs were fed *ad libitum* a based diet prepared locally and formulated according to energy and dietary amino acid requirements of growing pigs [52]. Two different batches of wheat were used in the diets, one control batch was free of mycotoxin-contamination and one batch was naturally contaminated with DON (Table 5). Type A trichothecenes (diacetoxyscirpenol, T-2 toxin, HT-2 toxin and 15-acetoxyscirpenol), type B trichothecenes (DON, 3-acetyl DON, 15-acetyl DON and nivalenol), Zearalenone (ZEA) and ochratoxin were analysed in the final diet. Mycotoxins were analysed using Liquid Chromatography coupled with tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) techniques and their detection limit was 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  feed (Laboratory LDA 22, Ploufragan, France). Only mycotoxins which were detected at least in one of both experimental diets are presented in Table 5.

#### 4.3. Zootechnical performances and sample collection

Pigs were weighted weekly. The daily weight gain was calculated per animal and feed intake was measured per pen, per week during the four weeks of the experiment. Feed conversion ratio was calculated by week per pen on the basis of the consumption.

Faecal samples were individually collected on day 0 (before DON exposure), and days 7, 14, and 28 of the experiment. Samples were immediately divided into two fractions and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ : one fraction was used to count intestinal bacterial populations by cultural methods (see bacteriological counts), the other being used to perform molecular analysis by Capillary Single-Stranded Conformation Polymorphism (CE-SSCP).

#### 4.4. Bacteriological counts

*Media:* Tryptone salt tubes (ref. 42076) were obtained from Biomerieux (Craponne, France), Tryptone sulfite-cycloserine (TSC, AEB152892), and peptone water (AEB140302) were purchased from AES Chemunex company (Bruz, France). Tryptone soya agar (TSA, CM0131) was obtained from Oxoid (Dardilly, France). The D-Cycloserin antibiotic was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, USA).

**Table 5.** Ingredient, nutrient composition and mycotoxin contamination of the experimental diets.

	<b>Diet</b>	
	<b>Control</b>	<b>Contaminated</b>
<b>Energy</b>		
Net energy (MJ.kg <sup>-1</sup> )	9.6	9.6
<b>Composition (%)</b>		
CleanWheat	65	0
Contaminated wheat	0	65
Soybean meal	19.5	19.5
Barley	8.5	8.5
Lucerne	3	3
Calcium phosphorus	1.25	1.25
Clay	1	1
Iodised salt	0.3	0.3
Limestone	0.2	0.2
Additives	0.08	0.08
Vitamins and mineral mixture <sup>1</sup>	1.07	1.07
<b>Nutrient component (%)</b>		
Dry matter	87.0	87.2
Mineral matter	6.2	6.1
Brut organic matter	80.9	81.1
Crude fat	3.1	3.2
Nitrogen extract	18.2	18.3
Cellulose	2.8	3.2
Amidon	43.4	42.7
<b><u>Mycotoxin (µg.kg<sup>-1</sup>)</u></b> <sup>(2)</sup>		
Deoxynivalenol (DON)	65	2700
15-acetyl DON	nd <sup>(3)</sup>	20
Nivalenol	nd	75
Zearalenone	nd	275

<sup>(1)</sup> Provided per kilogram of diet: vitamin A, 13,910 IU (IU, International Unit); vitamin D3, 5,350 IU; vitamin E, 26.8 IU; vitamin B1, 2.5 IU; vitamin K3, 4.3 IU; vitamin C, 21.4 IU; copper sulphate, 16 mg; iron carbonate, 69.5 mg; manganese, 96.3 mg; zinc, 91 mg. <sup>(2)</sup> Only mycotoxins detected in at least in one of the experimental diets are mentioned. <sup>(3)</sup> nd = not detectable

**Bacterial culture:** Due to experimental limitations, analyses could not be performed on fresh samples. Hence, individual samples were frozen at -20 °C. In order to control the effect of freezing on bacterial counts, at each sampling day, a sample (15 g) obtained from a pool of fresh faeces from six control animals was analysed by plate counting before and after freezing. Individual and pool samples were



thawed in ice for 1 hour before plating. Fifteen grams of thawed faeces were poured in buffered peptone water at 1:10 (w/v). The samples were serially 10-fold diluted and 3 dilutions of each sample were plated. Two intestinal bacterial populations were investigated: Anaerobic Sulfite-Reducing bacteria (ASR) and Aerobic Mesophilic Bacteria (AMB). AMB colonies were counted using a Spiral<sup>®</sup> DS Plus plater (Interscience, St Nom-La-Breteche, France) after 48 h of growth on TSA plates (30 °C). ASR colonies were counted on plates after 24 h of growth in TSC (37 °C) in sealed jars using the AnaeroGen<sup>™</sup> (Oxoid, Dardilly, France) system to create an oxygen-reduced atmosphere. The concentration of bacteria in the original sample was calculated as the mean of three dilutions for each faecal sample. The results are expressed as the mean of CFU/g from six animals  $\pm$  Standard Error (SE).

#### 4.5. Capillary Single-Stranded Conformation Polymorphism (CE-SSCP) analysis

Intestinal flora evolution was evaluated by comparison of 48 CE-SSCP profiles from 12 individual faecal samples.

*DNA extraction:* Two hundred mg of thawed faeces were diluted in 1.4 mL of lysis buffer (QIAamp<sup>®</sup> DNA stool mini-kit, Qiagen, France) and vortexed until completely dissolved. DNA extraction was carried out by using the QIAamp<sup>®</sup> DNA stool mini-kit according to the manufacturer instructions. Extracted DNA was loaded on 1% agarose gel in order to verify its quality.

*PCR amplification:* For the total microflora analysis, DNA was amplified from 1  $\mu$ L of extracted DNA solution, and added to the PCR mixture containing 1.3  $\mu$ L of dNTP (Stratagene, France) (10mM), 5  $\mu$ L of buffer 10X, 1.3  $\mu$ L of each primer (100 ng/ $\mu$ L), 0.5  $\mu$ L of *pfu* turbo DNA polymerase (Stratagene, France) (2.5 U/ $\mu$ L), and 40.9  $\mu$ L of high-purified water. The targeting DNA sequence of the V3 region of DNA 16S was used for total bacteria recognition with already published primers [53] w49 (AGGTCCAGACTCCTACGGG) and w104\* (\*TTACCGCGGCTGCTGGCAC) (Sigma-Proligo, UK). Primer w104\* was labelled with 5'-6 Fam fluorescent dye. Primer w49 was labelled with Hex fluorescent dye. These primers are specific for the Eubacteria phylogenic domain. The mix was run for 2 min at 94°C, then 25 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 61°C, 30 sec at 72°C, and 10 min at 72°C. PCR reactions were performed with a Gene Amp 9700 or 2400 (Applied Biosystems, France). After amplification, 10  $\mu$ L of the amplified product were run on a horizontal 2% agarose gel in TBE 1X, with a DNA ladder of 100 bp size in order to control PCR reactions (Ozyme, France). Gels were stained with Ethidium Bromide (0.5  $\mu$ g/mL) during 20 min and the images were captured under U.V. illumination by a video system.

*CE-SSCP electrophoresis:* Each DNA from PCR product from was diluted in water according to the intensity signal observed on the agarose gel to obtained standardised samples. 1  $\mu$ L of the standardised proportion of PCR product was diluted in high purified water (1:5, v:v) and then mixed with 18.5  $\mu$ L of sequencing buffer mix and 0.5  $\mu$ L of internal standard HD 400 [rox] (Applied Biosystems, Foster City, USA). After a denaturing step at 95°C during 5 min, the mix was quickly cooled on ice during 10 min before capillary electrophoresis conducted in a Genetic Analyser 3100-Avent (Applied Biosystems, France).

The CE-SSCP gel composition was 6.22 g of CAP polymer (Applied Biosystem, Foster City, USA), 1 g of glycerol (In Vitrogen, France), 1 mL of 10X buffer (Applied Biosystem, Foster City, USA), completed to 10 mL with Milli-Q water. Capillary Electrophoresis was run at 32°C under 15kV. Each 48 PCR products were analysed by 2 CE-SSCP runs. The statistical analysis by the mixed linear model (see below) was performed on duplicate CE-SSCP profiles of all the 48 samples.

#### 4.6. Data analysis

All data analyses were computed with the SAS software (SAS, 2004).

*Zootechnical data:* The zootechnical data are the mean  $\pm$  Standard Error (SE) of results obtained from twelve or six animals, depending on the date of sacrifice of the animal. These data were analysed by ANOVA test for repeated and correlated series, after checking for the homogeneity of the residual variance (Hartley's test).

#### *Bacteriological data*

*Bacteriological counts.* Bacteriological count data are expressed as the mean of log (CFU/g)  $\pm$  Standard Error (SE) from six animals. Statistical analyses were performed with the linear mixed model (see below).

*CE-SSCP.* The SSCP fingerprints were analysed with the GeneMapper™ software (Applied Biosystem, Foster City, USA) with a minimum peak height threshold of 50 Relative Units of Fluorescence (RFUs). Profiles obtained were stacked according to the internal standard position. To compare CE-SSCP patterns, additional alignments were done in order to adjust the peak positions of all standardized profiles, using a "profile reference" having the highest number of detectable peaks. The peaks were selected according to contrast analysis associated with linear mixed models.

*Diversity and Richness Indexes.* The Simpson index of dominance,  $S = 1 - \sum P_i^2$ , where  $P_i$  is the proportion of the peaks area  $i$  ( $a_i$ ) in CE-SSCP profiles ( $P_i = a_i / \sum a_i$ ). The  $S$  index measures the probability that two individuals randomly selected from a sample will belong to the same species. The diversity decreases when the dominance increases. The Richness  $R$  was estimated as the number of peaks present in a profile divided by the maximum number of peaks detectable in a profile (44 peaks) for CE-SSCP patterns obtained from dominant population analysis [49].

*Statistical models:* Linear mixed models were computed with the MIXED procedure of the SAS software [54]. Random and repeated effects were used for both bacterial count and CE-SSCP statistical analysis [55-58]. Treatments by time interaction are introduced into the model as fixed effects in accordance with the design of the study. Animals were incorporated into the model as a repeated measurement factor in order to take into account the within-animal covariability. Finally, the intercept of the model was incorporated as a random effect using an unstructured covariance matrix. In the case of a significant treatment by time interaction, an alternative to multiple comparison procedures, that

are not available with linear mixed models, was the use of a limited number of contrasts to test hypotheses of interest. Contrasts were defined to compare both conditions for each time. The repeatability between 2 CE-SSCP runs was included in the linear mixed model and p values between 2 repetitions were determined.

## 5. Conclusions

The mechanism of action of DON on eukaryotic cells is well documented but the effect of this toxin on the intestinal microbiota is largely unknown. In the present study, analysing the CE-SSCP profile of faecal flora, we demonstrate for the first time that DON modifies the intestinal microbiota of the animals. Further analyses are needed to better identify the observed changes.

## Acknowledgements

This work was financially supported by the INRA-AFSSA National Coordination Program. Y. Waché was supported by an AFSSA thesis grant. We would like to thank R. Cariolet and operational staff for supply and care of the animals. Furthermore, M. Queguiner, J. Laffont and E. Boilletot are gratefully acknowledged for valuable technical assistance. We also extend our grateful thanks to Dr J.M. Fairbrother for his help with the English text.

## References and Notes

1. CAST Report, Council for Agricultural Science and Technology. *Mycotoxins: Risks in plant, Animal, and Human Systems*. Ames, IA, USA, 2003.
2. Oswald, I.P.; Comera, C. Immunotoxicity of mycotoxins. *Rev. Med. Vet.* **1998**, *149*, 585-590.
3. SCOOP Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake of the population of EU member states. Directorate-general health and consumer protection. Available at <http://europa.eu.int:comm/food:fs:scoop:task3210.pdf>, 2003; accessed October 20, 2008.
4. Smith, J.E.; Henderson, R.S. *Mycotoxins and Animal Foods*, 1<sup>st</sup> Ed.; CRC press: Boca Raton, FL, USA, 1991; p. 875.
5. Rotter, B.A.; Prelusky, D.B.; Pestka, J.J. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health* **1996**, *48*, 1-34.
6. Pestka, J.J.; Smolinski, A.T. Deoxynivalenol: Toxicology and potential effects on humans. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* **2005**, *8*, 39-69.
7. Etienne, M.; Wache, Y. Biological and physiological effects of deoxynivalenol (DON) in the pig. In *Mycotoxins in Farm Animals*, 1<sup>st</sup> Ed.; Oswald, I.P., Taranu, I., Eds.; Research Signpost: Kerala, India, 2008; pp. 113-130.
8. Prelusky, D.B.; Hartin, K.E.; Trenholm, H.L.; Miller, J.D. Pharmacokinetic fate of <sup>14</sup>C-labeled deoxynivalenol in swine. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1988**, *10*, 276-286.
9. Eriksen, G.S.; Pettersson, H.; Lindberg, J.E. Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs. *Arch. Tierernahr.* **2003**, *57*, 335-345.

10. Cote, L.M.; Beasley, V.R.; Bratich, P.M.; Swanson, S.P.; Shivaprasad, H.L.; Buck, W.B. Sex-related reduced weight gains in growing swine fed diets containing deoxynivalenol. *J. Anim. Sci.* **1985**, *61*, 942-950.
11. Bouhet, S.; Oswald, I.P. The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2005**, *108*, 199-209.
12. Maresca, M.; Mahfoud, R.; Garmy, N.; Fantini, J. The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 2723-2731.
13. Awad, W.A.; Razzazi-Fazeli, E.; Bohm, J.; Zentek, J. Influence of deoxynivalenol on the D-glucose transport across the isolated epithelium of different intestinal segments of laying hens. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* **2007**, *91*, 175-180.
14. Awad, W.A.; Razzazi-Fazeli, E.; Bohm, J.; Zentek, J. Effects of B-trichothecenes on luminal glucose transport across the isolated jejunal epithelium of broiler chickens. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* **2008**, *92*, 225-230.
15. Van De Walle, J.; Romier, B.; Larondelle, Y.; Schneider, Y.J. Influence of deoxynivalenol on NF-kappaB activation and IL-8 secretion in human intestinal Caco-2 cells. *Toxicol. Lett.* **2008**, *177*, 205-214.
16. Pinton, P.; Accensi, F.; Beauchamp, E.; Cossalter, A.M.; Callu, P.; Grosjean, F.; Oswald, I.P. Ingestion of deoxynivalenol (DON) contaminated feed alters the pig vaccinal immune responses. *Toxicol. Lett.* **2008**, *177*, 215-222.
17. Maresca, M.; Yahi, N.; Younes-Sakr, L.; Boyron, M.; Caporiccio, B.; Fantini, J. Both direct and indirect effects account for the pro-inflammatory activity of enteropathogenic mycotoxins on the human intestinal epithelium: Stimulation of interleukin-8 secretion, potentiation of interleukin-1beta effect and increase in the transepithelial passage of commensal bacteria. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *228*, 84-92.
18. Kollarczik, B.; Gareis, M.; Hanelt, M. *In vitro* transformation of the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone by the normal gut microflora of pigs. *Nat. Toxins* **1994**, *2*, 105-110.
19. Eriksen, G.S.; Pettersson, H.; Johnsen, K.; Lindberg, J.E. Transformation of trichothecenes in ileal digesta and faeces from pigs. *Arch. Tierernahr.* **2002**, *56*, 263-274.
20. He, P.; Young, L.G.; Forsberg, C. Microbial transformation of deoxynivalenol (vomitoxin). *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 3857-3863.
21. Niderkorn, V.; Boudra, H.; Morgavi, D.P. Binding of Fusarium mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *101*, 849-856.
22. Young, J.C.; Zhou, T.; Yu, H.; Zhu, H.; Gong, J. Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 136-143.
23. Tenk, I.; Fodor, E.; Szathmary, C. The effect of pure Fusarium toxins (T-2, F-2, DAS) on the microflora of the gut and on plasma glucocorticoid levels in rat and swine. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. [A]* **1982**, *252*, 384-393.
24. Tanguy, M.; Burel, C.; Pinton, P.; Guerre, P.; Grosjean, F.; Queguiner, M.; Cariolet, R.; Tardieu, D.; Rault, J.C.; Oswald, I.P.; Fravallo, P. Effets des fumonisines sur la santé du porc: sensibilité aux salmonelles et statut immunitaire. *Journées Rech. Porcine* **2006**, *38*, 393-398.

25. Becker, B.; Bresch, H.; Schillinger, U.; Thiel, P.G. The effect of fumonisin B<sub>1</sub> on the growth of bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *13*, 539-543.
26. Hopwood, D.E.; Pethick, D.W.; Hampson, D.J. Increasing the viscosity of the intestinal contents stimulates proliferation of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Brachyspira pilosicoli* in weaner pigs. *Br. J. Nutr.* **2002**, *88*, 523-532.
27. Pluske, J.R.; Kim, J.C.; Hansen, C.F.; Mullan, B.P.; Payne, H.G.; Hampson, D.J.; Callesen, J.; Wilson, R.H. Piglet growth before and after weaning in relation to a qualitative estimate of solid (creep) feed intake during lactation: A pilot study. *Arch. Anim. Nutr.* **2007**, *61*, 469-480.
28. Sneath, P.H.; Sokal, R.R. Numerical taxonomy. *Nature* **1962**, *193*, 855-860.
29. Marteau, P. Factor controlling the bacterial microflora. In *Gut microflora: digestive physiology and pathology*, 1<sup>st</sup> Ed.; Rambaud, J.C., Buts, J.P., Cortier, G., Flourié, B., Eds.; J. Libbey Eurotext, DL: Paris, France, 2006; pp. 37-55.
30. Rotter, B.A.; Thompson, B.K.; Lessard, M.; Trenholm, H.L.; Tryphonas, H. Influence of low-level exposure to Fusarium mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1994**, *23*, 117-124.
31. Alm, H.; Brussow, K.P.; Torner, H.; Vanselow, J.; Tomek, W.; Danicke, S.; Tiemann, U. Influence of Fusarium-toxin contaminated feed on initial quality and meiotic competence of gilt oocytes. *Reprod. Toxicol.* **2006**, *22*, 44-50.
32. Pollmann, D.S.; Koch, B.A.; Seitz, L.M.; Mohr, H.E.; Kennedy, G.A. Deoxynivalenol-contaminated wheat in swine diets. *J. Anim. Sci.* **1985**, *60*, 239-247.
33. Bergsjö, B.; Langseth, W.; Nafstad, I.; Jansen, J.H.; Larsen, H.J. The effects of naturally deoxynivalenol-contaminated oats on the clinical condition, blood parameters, performance and carcass composition of growing pigs. *Vet. Res. Commun.* **1993**, *17*, 283-294.
34. Prelusky, D.B.; Gerdes, R.G.; Underhill, K.L.; Rotter, B.A.; Jui, P.Y.; Trenholm, H.L. Effects of low-level dietary deoxynivalenol on haematological and clinical parameters of the pig. *Nat. Toxins* **1994**, *2*, 97-104.
35. Swanson, S.P.; Helaszek, C.; Buck, W.B.; Rood, H.D., Jr.; Haschek, W.M. The role of intestinal microflora in the metabolism of trichothecene mycotoxins. *Food. Chem. Toxicol.* **1988**, *26*, 823-829.
36. Tzortzis, G.; Goulas, A.K.; Gee, J.M.; Gibson, G.R. A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous *in vitro* fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs *in vivo*. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 1726-1731.
37. Mai, V.; Morris, J.G.J. Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age. *J. Nutr.* **2003**, *134*, 459-464.
38. Stombeck, D.R.; Guilford, W.G., *Small animal gastroenterology*, 2<sup>nd</sup> Ed.; Sonogate Publishing: Davis, CA, USA, 1990; pp. 224-241.
39. Jensen, T.K.; Boye, M.; Møller, K.; Leser, T.D.; Jorsal, S.E. Association of *Serpulina hyodysenteriae* with the colonic mucosa in experimental swine dysentery studied by fluorescent *in situ* hybridization. *Apmis* **1998**, *106*, 1061-1068.
40. Zoetendal, E.G.; Akkermans, A.D.; De Vos, W.M. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 3854-3859.

41. Peu, P.; Brugere, H.; Pourcher, A.M.; Kerouredan, M.; Godon, J.J.; Delgenes, J.P.; Dabert, P. Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 3578-3585.
42. Tanguy, M.; Pissavin, C.; Queguiner, M.; Cariolet, R.; Le Diguierher, G.; Burel, C.; Fravallo, P. Utilisation de la PCR-SSCP capillaire pour l'etude de la flore digestive de groupes de porcs EOPS. *Journées Rech. Porcine* **2007**, *39*, 369-376.
43. Mul, A.J.; Perry, F.G. The role of fructo-oligosaccharides in animal nutrition. In *Recent advances in Animal Nutrition*, 2<sup>nd</sup> Ed.; Garnsworthy, P.C., Cole, D.J.A., Eds.; Nottingham University Press: Nottingham, UK, 1994; pp. 57-79.
44. Simpson, J.M.; McCracken, V.J.; Gaskins, H.R.; Mackie, R.I. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 4705-4714.
45. Gelsomino, A.; Keijzer-Wolters, A.C.; Cacco, G.; van Elsas, J.D. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Meth.* **1999**, *38*, 1-15.
46. Tiedje, J.M. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology* **1999**, *13*, 109-122.
47. Baker, G.C.; Cowan, D.A. 16 S rDNA primers and the unbiased assessment of thermophile diversity. *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32*, 218-221.
48. Klappenbach, J.A.; Saxman, P.R.; Cole, J.R.; Schmidt, T.M. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 181-184.
49. Loisel, P.; Harmand, J.; Zemb, O.; Latrille, E.; Lobry, C.; Delgenes, J.P.; Godon, J.J. Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environ. Microbiol.* **2006**, *8*, 720-731.
50. Pryde, S.E.; Richardson, A.J.; Stewart, C.S.; Flint, H.J. Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen, and cecal lumen of a pig. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 5372-5377.
51. Hong, H.; Pruden, A.; Reardon, K.F. Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. *J. Microbiol. Methods* **2007**, *69*, 52-64.
52. INRA, A. *Table de composition et de valeur nutritive des matieres premières destinées aux animaux d'élevage*; INRA: Paris, France, 2002.
53. Delbes, C.; Moletta, R.; Godon, J. Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2001**, *35*, 19-26.
54. SAS. *SAS OnLineDoc version 9.1*. Cary, NC, USA, 2004.
55. Laird, N.M.; Ware, J.H. Random-effects models for longitudinal data. *Biometrics* **1982**, *38*, 963-974.
56. Wolfinger, R.D. An example of using mixed models and PROC MIXED for longitudinal data. *J. Biopharm. Stat.* **1997**, *7*, 481-500.

57. Littell, R.C.; Henry, P.R.; Ammerman, C.B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* **1998**, *76*, 1216-1231.
58. Forno, E.; Onderdonk, A.B.; McCracken, J.; Litonjua, A.A.; Laskey, D.; Delaney, M.L.; Dubois, A.M.; Gold, D.R.; Ryan, L.M.; Weiss, S.T.; Celedon, J.C. Diversity of the gut microbiota and eczema in early life. *Clin. Mol. Allergy* **2008**, *6*, 11.

© 2009 by the authors; licensee Molecular Diversity Preservation International, Basel, Switzerland. This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

## **2. Impact du DON sur le portage asymptomatique de salmonelles chez le porc**

Cette étude a été menée dans le but de déterminer si l'ingestion en continu et sur une période de plusieurs semaines d'un aliment naturellement contaminé en DON avait une influence sur le portage asymptomatique de *Salmonella* Typhimurium chez des porcs en phase de croissance. Outre le suivi de symptômes cliniques éventuels, nous avons choisi d'étudier les paramètres zootechniques généraux et, dans une approche expérimentale, de nous intéresser à la persistance de *Salmonella* spp. dans les tissus et organes, au niveau de l'excrétion, ainsi qu'à la séroconversion chez les animaux.

### **Matériels et Méthodes**

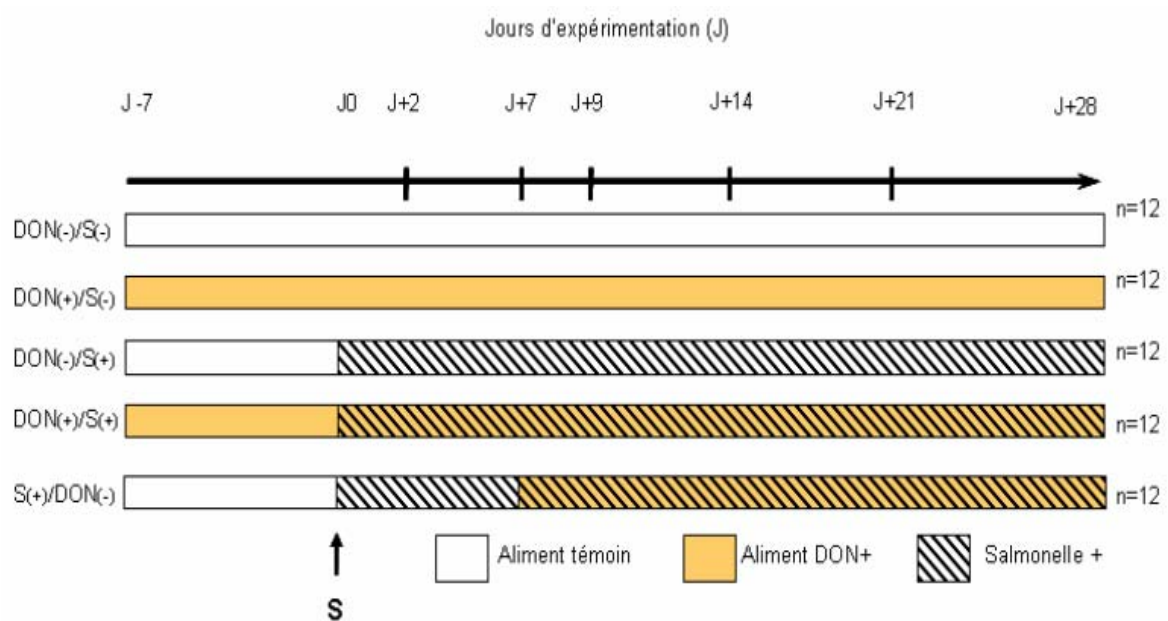
#### **Animaux et logement**

Pour le deuxième travail expérimental, le protocole d'expérimentation animale a été effectué en parallèle de celui détaillé dans l'étude précédente (cf. page 93 : Wache *et al.* (2009), Experimental section), mais sur un total de 72 porcs. De la même manière, les porcelets de 9 semaines d'âge ont été logés et alimentés pendant 5 semaines avec un aliment contaminé ou non par 2,7 ppm de DON, afin de tester l'effet du DON sur le niveau de portage asymptomatique de *Salmonella* Typhimurium.

#### **Préparation de la souche *Salmonella* Typhimurium**

La souche bactérienne utilisée pour les inoculations était *Salmonella enterica* sérotype Typhimurium résistante à la rifampicine. Avant inoculation, la souche a été isolée sur milieu Trypton Soja Agar Yeast Extract, TSAYE (AES-Chemunex, France) puis incubée en bouillon de culture pendant 16 heures à 37°C, pour atteindre une concentration de l'ordre de 10<sup>9</sup> UFC/ml (Unité Formant Colonie). Après deux lavages en solution de Tryptone Sel, TS (Biomérieux, France), la suspension mère a été dénombrée et ajustée dans 10 ml de TS à une concentration de 10<sup>5</sup> UFC/ml. Les animaux ont été inoculés par voie orale, avec une dose de 10<sup>6</sup> UFC de *Salmonella* Typhimurium avant ou après l'introduction de l'aliment contaminé.





**Figure 3:** Distribution et traitements des animaux lors de l'essai sur l'effet d'une post inoculation des animaux recevant un aliment contaminé en DON. **S**, inoculation *per os* de *Salmonella* Typhimurium avec  $10^6$  UFC de bactérie.

## Schéma expérimental et traitements

Au cours de notre étude, cinq traitements différents ont été testés afin d'évaluer l'influence d'une alimentation contaminée en DON sur des animaux infectés par *Salmonella* Typhimurium. Un chiffonnage du sol de chaque parc a été réalisé sept jours avant inoculation de l'agent infectieux (J-7) dans le but d'effectuer une recherche de *Salmonella* spp. Un chiffonnage supplémentaire a été réalisé en fin d'essai afin de vérifier l'absence de *Salmonella* spp. dans les animaleries des animaux non-infectés. Conformément au protocole établi pour le suivi des porcs EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques) de la station, des contrôles bactériologiques sur les animaux, les locaux d'élevage et les aliments, ainsi que des contrôles sérologiques sur animaux ont été réalisés afin de vérifier le statut sanitaire des animaux et l'absence de pathogènes majeurs chez les animaux et dans l'environnement. Pour deux des traitements avec mycotoxine, la seule différence a résidé dans la date de distribution de l'aliment contaminé : 7 jours avant infection ou 7 jours après infection (Figure 3).

### - Cas d'une Inoculation par *Salmonella* Typhimurium après contamination par le DON

A J-7, les animaux du groupe DON(-)/S(-) (n=12) et du groupe DON(-)/S(+) (n=12) ont reçu l'aliment témoin, alors que l'aliment contaminé en DON a été distribué aux porcs du groupe DON(+)/S(-) (n=12) et du groupe DON(+)/S(+) (n=12). Après sept jours d'expérimentation (10 semaines d'âge), les animaux des groupes DON(-)/S(+) et DON(+)/S(+) ont été inoculés individuellement par voie orale avec 10 ml de TS contenant  $10^6$  UFC de *Salmonella* Typhimurium marquée par un gène de résistance à la rifampicine, alors que les porcs des autres groupes ont reçu uniquement du TS.

Des euthanasies ont été réalisées par exsanguination après injection d'une dose létale de doléthal suivant des dates spécifiques à chaque groupe : 6 porcs (3 par parcs) des groupes DON(-)/S(-), DON(+)/S(-), DON(-)/S(+) et DON(+)/S(+) ont été sacrifiés 48 heures post-inoculation (J+2) et les 6 porcs restant de chacun des lots ont ensuite été abattus à la fin de l'étude (J+28).

### - Cas d'une Inoculation par *Salmonella* Typhimurium avant contamination par le DON

Pour des raisons d'organisation, et afin de pouvoir tester une influence du DON post-infection, 24 porcs ont été placés dans trois animaleries supplémentaires, et répartis selon trois groupes distincts : groupe S(-)/DON(-) (n=6), groupe S(+)/DON(-) (n=6) et groupe S(+)/DON(+) (n=12). Comme décrit précédemment, l'inoculation des animaux par *Salmonella*

Typhimurium a eu lieu 7 jours après le début de l'essai (J0). Tous les porcs recevaient un aliment non contaminé en début d'essai et, à J+7, les animaux du groupe S(+)/DON(+) ont reçu un aliment contaminé en DON, soit 7 jours post-inoculation. Les porcs de chaque groupe ont été abattus de la même manière que dans le cas précédent, mais à des dates différentes : 6 porcs 48 heures après introduction de l'aliment contaminé (J+9) et les six autres du groupe inoculé et alimenté en DON en fin d'essai (J+28), en comparaison des porcs abattus des groupes inoculés ou non et recevant un aliment témoin du premier essai.

### **Suivi zootechnique et prélèvements des échantillons**

Pendant la période expérimentale de 35 jours, les porcs ont été suivis quotidiennement et pesés toutes les semaines. La température corporelle, l'évaluation visuelle de l'aspect des fécès, ainsi que l'observation d'éventuels signes cliniques et pathologiques ont été réalisés quotidiennement et de façon individuelle pour tous les lots. La consommation d'aliment et l'indice de consommation ont été calculés par semaine et par parc, sur la base de la quantité d'aliment distribué et des refus alimentaires. Le gain de poids moyen quotidien (GMQ) a été calculé pour chaque animal. Des prélèvements de matières fécales ont été effectués à J-7 (avant introduction de l'aliment contaminé), J0 (avant inoculation), J+2, J+7, J+9, J+14, J+21 et J+28, afin de réaliser une recherche et un dénombrement de *Salmonella* spp. et des coliformes thermotolérants sur fécès frais.

Des prélèvements sanguins ont été réalisés à la veine jugulaire dans des tubes secs Vacutainer® (Greiner Bio-one, Autriche), aux mêmes dates de prélèvements que les matières fécales. Les sérums ont été préparés par centrifugation (1000 g, 18°C, 15 min), puis stockés à -20°C. Lors de l'autopsie des animaux, les ganglions mésentériques, les contenus du cæcum et du colon ont été prélevés de façon stérile, de manière à éviter toute contamination exogène pour rechercher et dénombrer *Salmonella* spp.

### **Mesure de la concentration sérique en IgA:**

La concentration sérique en IgA a été mesurée par méthode ELISA (Enzyme linked immuno-sorbent assay) selon des protocoles décrits dans d'autres études (Pinton *et al.*, 2008). Des anticorps de chèvre anti-IgA de porcs (Bethyl, Interchim, Montluçon, France) ont été utilisés comme anticorps de capture. La Horseradish peroxidase (HRP) marquée contre les Ig de porcs et du substrat TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; Pierce, France) a été utilisée pour la détection des IgA. La réaction a été stoppée par ajout d'acide sulfurique 1N (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et les résultats ont été lus par absorbance à 450 nm sur un lecteur de plaque ELISA (Spectra

thermo, Tecan, Trappes, France), à l'aide du logiciel Biolise 2.0 (Labsystems, Cergy Pontoise, France). Les IgA ont été quantifiés en référence à une courbe standard, construite avec des échantillons dont la concentration en IgA est connue.

### **Evaluation du statut bactériologique des porcs**

#### *- Recherche et dénombrement de Salmonella spp.*

Les fécès récoltés lors de l'étude, ainsi que les contenus cœcaux et les ganglions mésentériques prélevés après autopsie des animaux ont été analysés immédiatement après prélèvement, afin de vérifier l'absence de *Salmonella* spp. Les échantillons des animaux inoculés ont été traités individuellement et ceux des animaux non-inoculés ont été poolés.

- *Présence/Absence de Salmonella spp.*

Pour chaque individu inoculé avec *Salmonella* Typhimurium, 10 à 25 grammes d'échantillons frais ont été dilués au  $1/10^{\text{ème}}$  dans un milieu de pré-enrichissement EPT (Eau Peptonée Tamponnée; AES-Chemunex, France) puis homogénéisés avant d'être incubés à 37°C pendant 16 à 20 heures. La méthode bactériologique qualitative de détection comprenait deux enrichissements effectués en parallèle, à partir de la solution de pré-enrichissement EPT: (1) un étalement de 100 µl sur une gélose semi-solide de Rappaport-Vassiliadis, MSR/V (Biocare, UK) et (2) un dépôt de 1 ml dans des tubes contenant 9 ml de milieu Müller-Kauffmann (MKttn) supplémenté au tetrathionate (2%) et novobiocine (0,004%), (Biocare, UK). Après une incubation de 24 heures à 41,5°C, les boîtes MSR/V ont été observées afin de confirmer la présence ou l'absence de *Salmonella* spp. Dans le cas de résultats négatifs, une deuxième recherche de *Salmonella* spp. a été effectuée sur ces échantillons en isolant 5 µl de solution MKttn sur un milieu de sélection Rambach agar (Merck, Allemagne). Les colonies caractéristiques ont enfin été confirmées par isolement sur milieu Vert Brillant supplémenté en rifampicine à 0,01%, VBrif (Sigma-Aldrich, France), ne permettant que la révélation de souche marquée.

- *Dénombrement de Salmonella Typhimurium*

Parallèlement, un protocole permettant une évaluation quantitative a été mis en œuvre afin de compléter la recherche de salmonelles. Un millilitre de milieu de pré-enrichissement en EPT a été dilué en série dans des tubes de TS, afin d'obtenir des concentrations de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$  UFC/ml. Les dilutions ont ensuite été ensemencées en trois répétitions, à l'aide de l'automate Spiral® DS Plus plater (Interscience, France) sur des boîtes de Pétri contenant du

milieu VBrif, puis incubées à 37°C pendant 24 heures avant dénombrement. La limite de dénombrement pour les échantillons était alors de 200 UFC/g de matière fécale.

- *Suivi Bactériologique des populations de coliformes thermotolérants*

Afin de dénombrer les populations de coliformes thermotolérants, 15 grammes de fécès ont été dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'EPT, incubés 24h à 37°C, puis dilués à nouveau en série au dixième, dans des tubes TS, afin d'obtenir des dilutions de solution mère de 10<sup>-2</sup> à 10<sup>-6</sup>. Cinquante microlitres des dilutions sériées ont été ensuite étalées à l'aide de l'automate Spiral<sup>®</sup> DS Plus plater (Interscience, France) sur des boîtes de Pétri contenant du milieu sélectif VRBL (Violet Red Bile Agar, AES-Chemunex, France), en réalisant deux répétitions par échantillon. Les colonies ont été comptées après 24 heures d'incubation à 44°C. Les résultats ont été exprimés en UFC/g de fécès.

### **Mesure de la séroconversion**

L'évolution des séroconversions après inoculation a été mesurée par méthode ELISA avec l'utilisation du kit de détection des anticorps dirigés contre les salmonelles du porc (HerdChek, Idexx, Suisse). Les échantillons de sérums ont été dilués au 1/20<sup>ème</sup> dans du tampon de dilution, puis 100 µl de chaque échantillon dilué ainsi que les contrôles négatifs et positifs du kit ont été répartis en 2 répétitions dans chaque puits, préalablement sensibilisé avec une suspension antigénique de LPS de *Salmonella* Typhimurium. Après une incubation de 30 min à température ambiante, les puits ont été lavés trois fois avec 300 µl de solution de lavage après élimination des surnageants. Cent microlitres de HRP anti-porcine conjugué ont ensuite été déposés dans chaque puits et incubé 30 min à température ambiante. Après trois lavages, 100 µl de TMB ont été ajoutés dans chaque puits, et les microplaques ont été incubées pendant 15 min à température ambiante. Après l'arrêt de la réaction par ajout de 100 µl de solution d'arrêt du kit, la densité optique (DO) de chaque puits a été lue avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 650 nm. Les résultats exprimant le nombre d'animaux ayant séroconverti à un temps t ont été exprimés en fonction d'un sérum de référence avec un seuil de positivité fixé à une DO de 0,4. Pour la mesure quantitative de la séroconversion, les résultats ont été calibrés par rapport aux sérums positifs et négatifs du kit et exprimés par l'indice de concentration moyen (ICs) d'anticorps dirigés contre *Salmonella* spp., selon le rapport suivant :

$$\text{ICs} = [(\text{DOech} - \text{DOneg}) / (\text{DOpos} - \text{DOneg})] \times (\text{DOpos} / \text{DOposM})$$

DOech = DO de l'échantillon

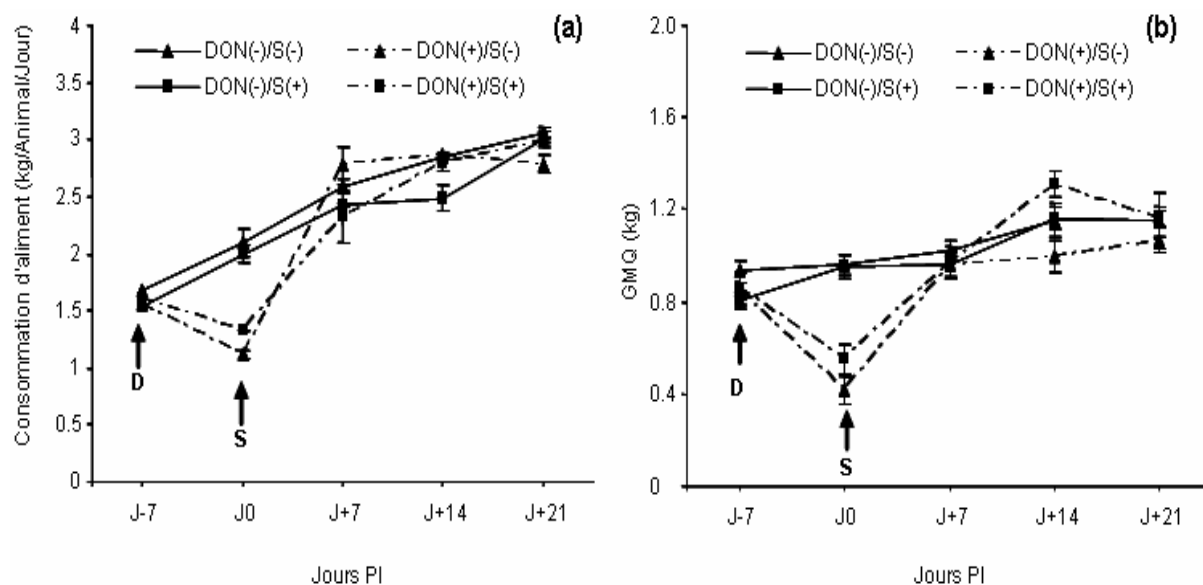
DOneg = DO du sérum négatif de contrôle du kit

DOpos = DO du sérum positif de contrôle du kit

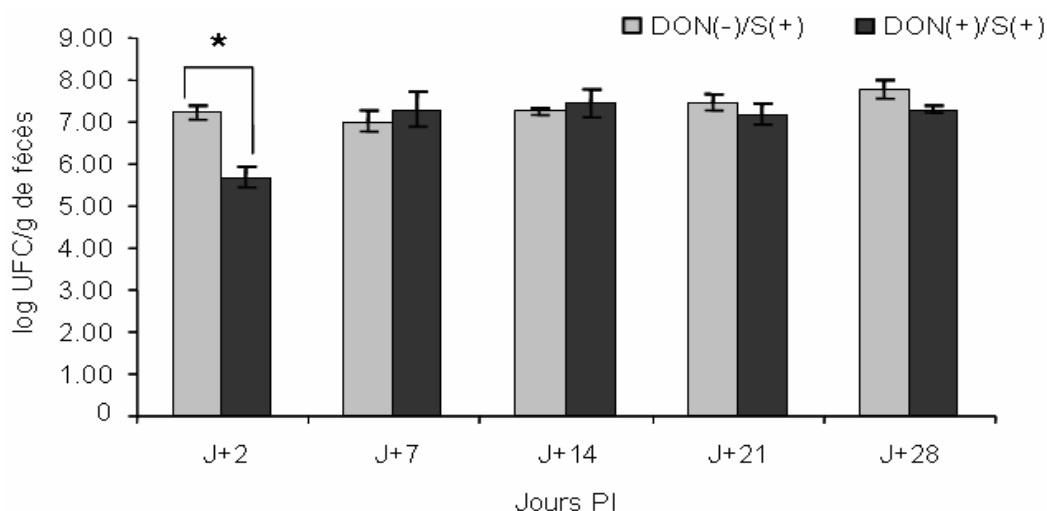
DOposM = DO moyenne des sérums positifs de l'ensemble des plaques

### **Analyses statistiques**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  l'Erreur Standard de la Moyenne (SEM) des valeurs obtenues pour les 6 ou 12 animaux par groupe pour chaque analyse expérimentale. L'évolution dans le temps au sein d'un même lot a ensuite été analysée par un test T de Student pour séries appariées, après vérification de l'homogénéité des variances. Enfin, un test d'analyse des variances (ANOVA) a été effectué pour observer des différences significatives entre deux traitements.



**Figure 4** : Consommation journalière d'aliment (a) et gain moyen quotidien, GMQ (b) des animaux des groupes expérimentaux. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM). La consommation des animaux est exprimée en kg d'aliment/jour/animal et le GMQ en kg de poids vif. **D** : introduction d'aliment contaminé. **S** : inoculation des animaux avec *Salmonella* Typhimurium.



**Figure 5** : Dénombrement des coliformes thermotolérants chez les porcs inoculés par *Salmonella* Typhimurium et recevant une alimentation témoin ou contaminée en DON. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM), et exprimés en log UFC/g de fécès. \*, différences significatives entre les deux groupes d'animaux ( $p < 0,05$ ).

## **Résultats:**

### ➤ **Exposition au DON avant infection**

#### **Etat de santé et performances zootechniques**

##### *- Suivi sanitaire des animaux*

D'une manière générale, aucun effet significatif de l'exposition au DON sur l'état de santé général des animaux n'a été observé au cours des 35 jours d'exposition. Aucune mortalité ni pathologie liée au portage de *Salmonella* Typhimurium n'a été observée non plus. Que ce soit en présence ou en absence de DON, les seuls signes cliniques visibles en lien avec l'inoculation de *Salmonella* Typhimurium ont été une hyperthermie passagère, sans aucun autre symptôme particulier et sans modification de la consistance des matières fécales. La température corporelle moyenne de l'ensemble des animaux a été de  $39,3^{\circ}\text{C} \pm 0,3$ . Les pics de température, avec un maximum à  $40,5^{\circ}\text{C}$ , ont été relevés chez les animaux infectés le lendemain de l'inoculation, chez 3 porcs recevant un aliment témoin et 2 porcs ingérant du DON.

##### *- Performances zootechniques*

Les performances zootechniques des animaux des différents groupes sont représentées dans la Figure 2. Le GMQ a été mesuré de façon individuelle tout au long de l'essai. En revanche, pour chaque groupe expérimental, la moyenne de la consommation alimentaire par animal et par jour a été calculée sur la base de la consommation par parc ( $n=6$ ). Une semaine avant l'introduction du DON dans l'alimentation, tous les animaux avaient un GMQ et une consommation d'aliment journalière identique. En fin d'expérimentation, il n'y avait pas non plus de différences entre les quatre lots d'animaux (Figure 4b). Aucune différence significative n'a été observée sur les résultats des paramètres zootechniques suite à l'inoculation à J+7 des porcs par *Salmonella* Typhimurium. Des différences significatives sont apparues en cours d'essai et en particulier après la première semaine d'expérimentation. En comparaison des groupes recevant un aliment témoin, le niveau de consommation dans les 2 groupes recevant un aliment contaminé a diminué de 44% (animaux infectés) et de 33% (animaux non infectés) au cours des 10 jours qui ont suivi le début de la distribution de l'aliment contaminé. Au regard de la proportion d'aliment retrouvée sous les auges, la baisse de consommation s'est accompagnée d'un gaspillage plus important. En parallèle, les animaux recevant un aliment contaminé ont présenté une diminution significative ( $p<0,05$ ) de



45 % de leur GMQ, dans chacun des deux lots, par rapport aux animaux recevant un aliment témoin. Lors de la deuxième semaine de l'essai, les porcs des groupes recevant un aliment contaminé, infectés ou non, ont augmenté significativement leur consommation d'aliment de  $1,12 \pm 0,03$  à  $2,77 \pm 0,17$  kg/jour et de  $1,33 \pm 0,01$  à  $2,32 \pm 0,23$  kg/jour, respectivement, pour atteindre un niveau de consommation équivalent à ceux des groupes recevant un aliment témoin. Leur GMQ s'est également amélioré dès la deuxième semaine (J+7), atteignant un niveau comparable à celui des animaux témoins 3 à 4 semaines après le début de la distribution des aliments expérimentaux.

### Statut bactériologique des animaux

#### - Recherche et dénombrement de *Salmonella Typhimurium*

Les deux lots non-inoculés par *Salmonella Typhimurium* ont été confirmés négatifs en recherche bactériologique sur les fèces pour les animaux vivants, ainsi que sur les contenus intestinaux, et les ganglions mésentériques pour les animaux abattus, et ce jusqu'à la fin de l'essai. Par ailleurs, les chiffonnettes faites dans les animaleries avant inoculation des animaux ainsi qu'en fin d'étude pour les groupes non inoculés sont restées également négatives.

**Tableau 2** : Evolution du nombre de porcs contaminés par *Salmonella Typhimurium* lors de l'essai sur l'ensemble des animaux inoculés

Echantillons	Concentration (UFC/g) <sup>(2)</sup>	Traitement									
		DON(-)/S(+)					DON(+)/S(+)				
		J+2 <sup>(1)</sup>	J+7	J+14	J+21	J+28	J+2	J+7	J+14	J+21	J+28
<b>Fèces (n= 6)</b>	>200	5/6 <sup>(3)</sup>	3/6	1/4	0/6		3/6	1/6	2/6	1/5	
	<200	1/6	3/6	3/4	6/6		3/6	5/6	4/6	4/5	
<b>Sur animaux abattus (n=6)</b>											
Ganglions mésentériques	>200	0/6				0/5	0/6				0/5
Caecum	>200	4/6				3/6	3/6				2/6
Colon	>200	1/6				3/6	3/6				3/6

<sup>(1)</sup> J, nombre de jours après inoculation avec *Salmonella Typhimurium*.

<sup>(2)</sup> Concentration établie par dénombrement (>200 UFC/g) ou par analyse « Présence/absence » (<200 UFC/g)

<sup>(3)</sup> Nombre d'échantillons (< ou > à 200 UFC/g) / nombre total d'échantillons positifs

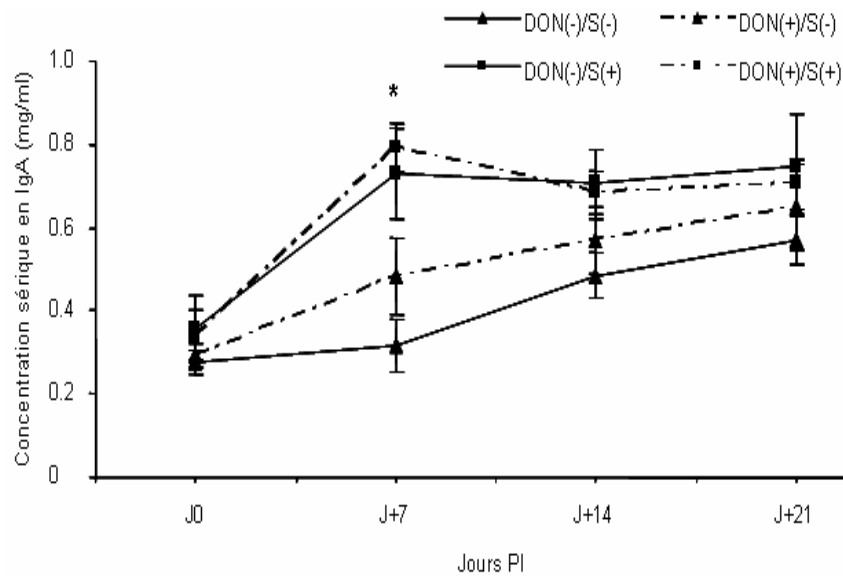
L'inoculation de *Salmonella* Typhimurium a entraîné le passage de tous les animaux à un statut excréteur dès le deuxième jour post-inoculation (PI) (Tableau 2). Le suivi du statut excréteur des porcs a montré que tous les animaux du groupe recevant un aliment témoin sont restés infectés tout au long de l'essai, alors qu'un porc sur 6 recevant un aliment contaminé a présenté un résultat négatif à J+21 PI. Au-delà de ce cas particulier, l'apport de DON n'a eu aucun effet vis à vis de la durée et de l'intensité de l'infection par *Salmonella* Typhimurium.

Bien que tous les échantillons prélevés aient été positifs dès J+2 PI, le niveau de contamination était inférieur au seuil de dénombrement (200 UFC/g) dans les ganglions mésentériques dans chacun des deux groupes à chaque date de prélèvement (Tableau 2). En début d'essai, le nombre de porcs infectés et dont la concentration en salmonelles dans le cæcum était dénombrable n'était pas exactement le même entre les deux groupes (4 chez les animaux recevant l'aliment contaminé vs 3 chez les animaux recevant un aliment témoin) et cet écart s'est retrouvé à J+28 PI (3 vs 2). Pour les échantillons prélevés au niveau du colon, seul un individu du groupe recevant un aliment témoin a présenté une concentration en salmonelles supérieure à 200 UFC/g à J+2 PI et trois dans l'autre groupe. Les contaminations en salmonelles observées dans chaque contenu de colon étaient identiques en fin d'étude dans les deux groupes d'animaux.

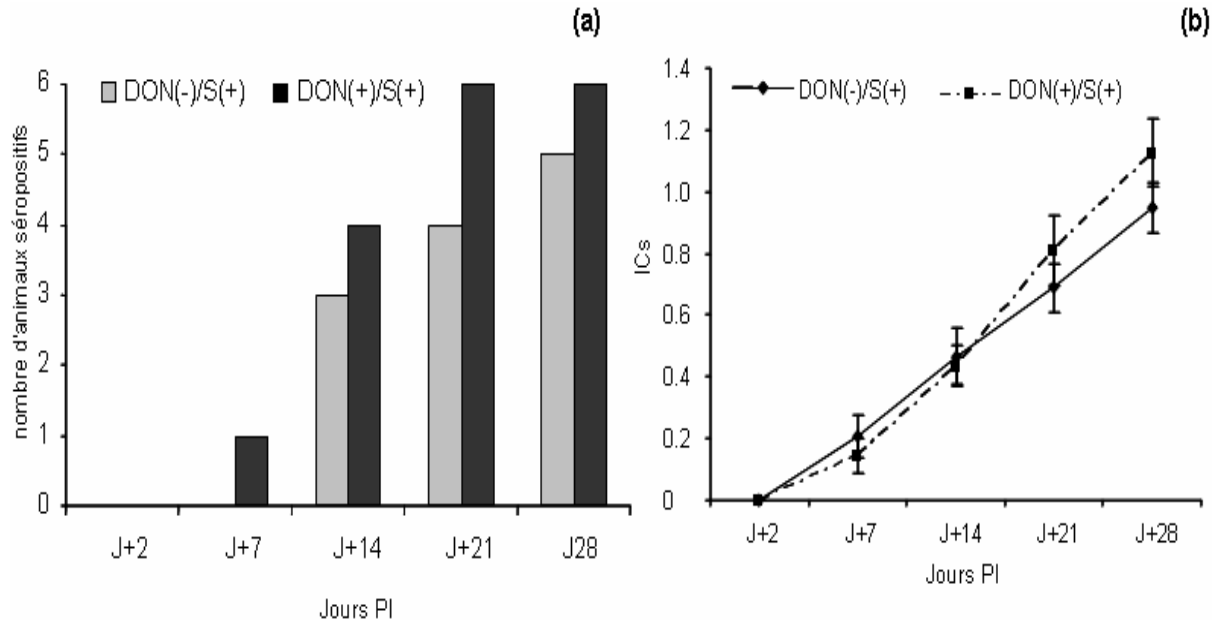
#### - Dénombrement des coliformes thermotolérants

Un dénombrement de la flore commensale dans les fécès de porc a été réalisé sur une population de bactéries spécifiques, les coliformes thermotolérants, représentée essentiellement par *Escherichia coli*, dans ce cas, sous sa forme commensale. Ce suivi a été effectué afin d'observer un éventuel effet du DON sur la flore intestinale des animaux infectés ou non par *Salmonella* Typhimurium. Tout au long de l'étude, les mesures effectuées chez les animaux des différents groupes ont donné un nombre de colonies de coliformes thermotolérants compris entre  $10^7$  et  $10^8$  UFC/g de fécès.

Aucune différence significative n'a été enregistrée chez les porcs ne recevant pas de DON, entre les groupes inoculés et les groupes non inoculés mais ayant reçu une solution placebo. Comme le montrent les résultats en figure 5, seuls les animaux inoculés du groupe recevant un aliment contaminé ont présenté une diminution transitoire et significative de 28% du nombre de coliformes thermotolérants dénombrées deux jours après inoculation, par



**Figure 6 :** Concentration sérique en IgA chez les porcs inoculés ou non avec *Salmonella* Typhimurium et recevant un aliment témoin ou contaminé en DON. Les résultats sont donnés par la moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM), et exprimés en mg/ml. \*, différences significatives entre les animaux inoculés ou non par *Salmonella* Typhimurium ( $p < 0,05$ ) et recevant un aliment similaire.



**Figure 7 :** Évolution du nombre de la séroconversion spécifique à *Salmonella* Typhimurium au cours du temps dans les groupes DON(-)/S(+) et DON(+)/DON(+). (a), évolution du nombre d'animaux séropositifs. (b), évolution de la concentration en anticorps dirigés contre *Salmonella* spp. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM). ICs, indice de concentration des anticorps dirigés contre *Salmonella* spp.

rapport au groupe recevant un aliment témoin. Aucune autre différence significative entre les lots n'a été observée pendant le reste de l'étude.

### **Paramètres sérologiques**

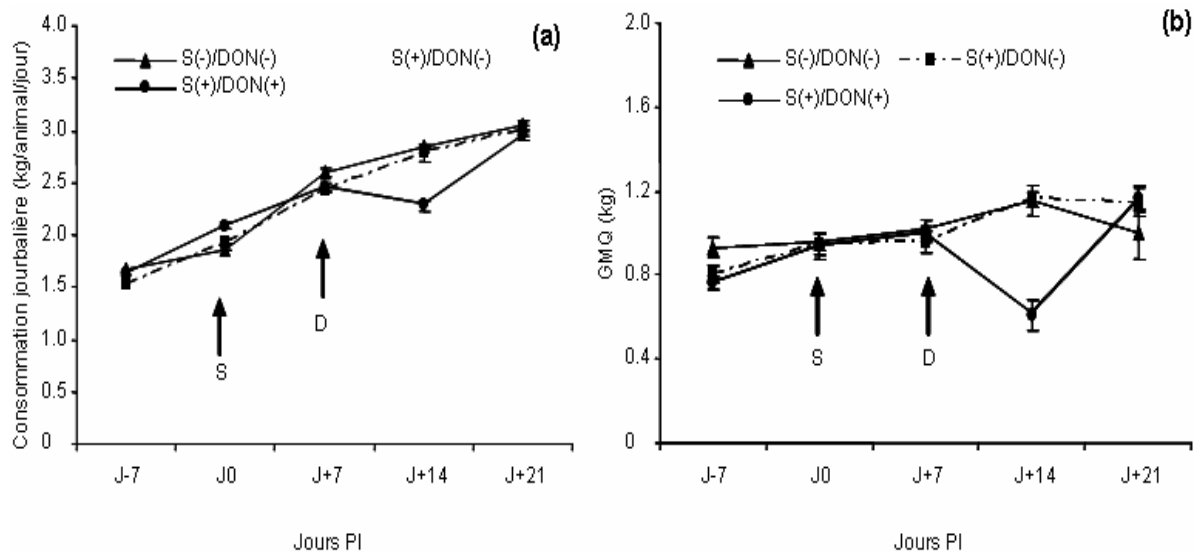
#### *- Concentration en IgA*

La concentration en IgA a été mesurée dans les sérums des animaux des différents groupes. Entre J0 et J+21 PI, la concentration moyenne pour les animaux des 4 lots a augmenté significativement ( $p < 0,05$ ) de  $0,394 \pm 0,043$  ng/ml à  $0,668 \pm 0,045$  ng/ml (Figure 6). Les porcs non inoculés ont présenté une augmentation régulière et quasiment identique de leur concentration sérique en IgA entre J0 et J+21. Pour les porcs infectés par *Salmonella* Typhimurium, cette augmentation est également bien présente sur la même période, avec un taux d'IgA significativement plus élevé (+58%,  $p < 0,01$ ) lors de la première semaine PI par rapport aux porcs non infectés (+39%). Dans ces deux groupes, une diminution de cette concentration a été observée lors de la deuxième semaine PI, avant de se stabiliser jusqu'à la fin de l'essai.

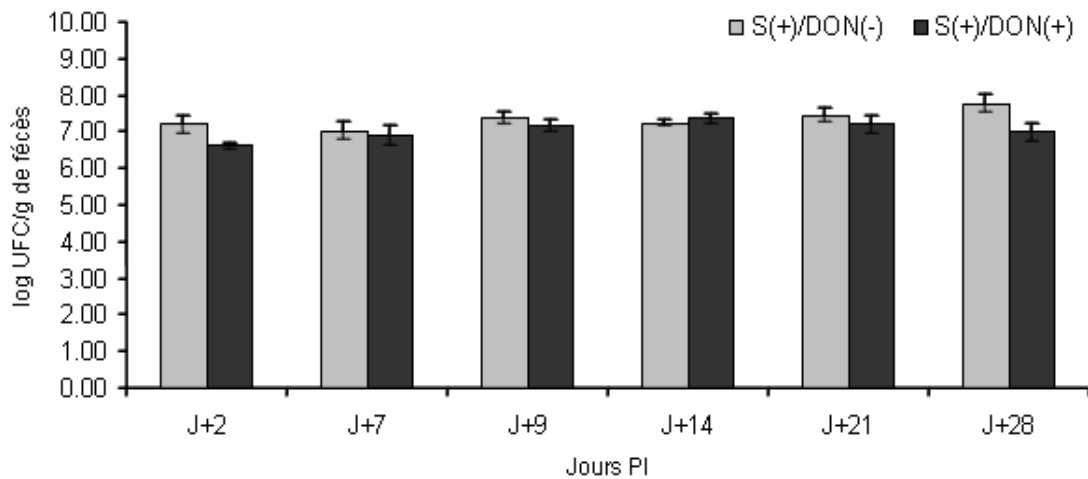
#### *- Séroconversion des porcs inoculés*

La séroconversion a été mise en évidence une semaine PI pour les porcs recevant un régime contaminé en DON et une semaine plus tard pour ceux recevant l'aliment témoin (Figure 7). Comparé au lot témoin infecté, le nombre d'animaux séropositifs était plus élevé dans le groupe recevant du DON tout au long de l'essai. De plus, tous les porcs exposés au DON étaient séropositifs trois semaines post-inoculation, alors qu'un animal était resté négatif en fin d'expérimentation dans le groupe aliment témoin (Figure 7a). Le nombre d'animaux par catégorie n'a pas permis d'analyser statistiquement ces différences.

Après la comparaison avec des sérums positifs, l'ICs des échantillons qui traduit le pourcentage de séroconversion des animaux a montré que l'intensité de la séroconversion n'était pas significativement différente entre les animaux positifs des deux groupes infectés quel que soit l'aliment distribué (Figure 7b).



**Figure 8 :** Consommation journalière (a) et gain moyen quotidien, GMQ (b), des animaux recevant un aliment contaminé 7 jours PI. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM). La consommation des animaux est exprimée en kg d'aliment /jour/animal et le GMQ en kg de poids vif. D : introduction d'aliment contaminé en DON. S : Inoculation des animaux avec *Salmonella* Typhimurium.



**Figure 9 :** Dénombrement des Coliformes thermotolérants présent dans les fécès des porcs inoculés par *Salmonella* Typhimurium en fonction du type d'aliment. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM), et exprimés en log UFC/g de fèces.

## ➤ Exposition au DON après infection

En parallèle du premier essai, les 24 porcs restant ont été répartis en trois lots expérimentaux, 12 animaux recevant un aliment témoin (6 non infectés et 6 animaux infectés) et 12 animaux infectés par *Salmonella* Typhimurium recevant un aliment contaminé, afin d'évaluer les effets de l'ingestion de DON sur des porcs déjà infectés par *Salmonella* Typhimurium. Les porcs infectés avaient été inoculés 7 jours avant l'introduction de l'aliment contaminé en DON. Dès le début de l'essai, les paramètres étudiés précédemment sur les autres groupes ont également été mesurés sur ces animaux pour les dates J-7, J0, J+7, J+9, J+14, J+21, et J+28.

### **Etat de santé et performances zootechniques**

Le suivi sanitaire des animaux n'a révélé aucune mortalité ni pathologie consécutive à l'infection ou à la présence de DON dans l'aliment, comme observé précédemment dans les premiers groupes expérimentaux. Sur la totalité de la durée de l'essai, aucun effet de l'inoculation par *Salmonella* Typhimurium sur la consommation alimentaire ou le GMQ des animaux n'a été observé dans les groupes et seuls 2 animaux inoculés sur 12 ont présenté une légère hyperthermie dans le groupe exposé au DON quelques jours après inoculation de *Salmonella* Typhimurium. Les résultats observés sur les performances zootechniques des animaux de ce deuxième essai ("DON post infection") apparaissent identiques à ceux enregistrés dans les autres lots. Tous les animaux ont présenté un GMQ et une consommation journalière d'aliment équivalent en début et en fin d'essai (Figure 8).

Après l'incorporation de DON, le GMQ des animaux a diminué significativement de  $1,00 \pm 0,04$  kg à  $0,61 \pm 0,07$  kg pendant la semaine suivant le début de la distribution de l'aliment contaminé. Dans le même temps, la consommation des animaux inoculés et exposés au DON a baissé de 8% alors que l'évolution de la consommation alimentaire est restée linéaire dans les autres groupes (Figure 8a). Que le DON soit administré 7 jours avant ou 7 jours après l'infection, il entraîne une diminution significative du GMQ et de la consommation alimentaire des animaux pendant une semaine. Tout comme observé lors d'une infection après exposition au DON, ces paramètres redeviennent équivalents dans chacun des groupes, 2 à 3 semaines après le début de la distribution de l'aliment contaminé.

## Statut bactériologique des animaux

### - Recherche et dénombrement de *Salmonella Typhimurium*

A J+7 et J+28 PI, l'analyse des échantillons de fèces a révélé la présence de *Salmonella Typhimurium* chez tous les animaux inoculés (Tableau 3), sans qu'aucun effet ne soit apparu avec l'apport de DON. Pour les contenus intestinaux, une proportion plus importante d'échantillons prélevés à l'abattage à J+9 PI, ayant une concentration en *Salmonella Typhimurium* supérieure au seuil de dénombrement (200 UFC/g) a été observée dans le groupe recevant un aliment témoin.

**Tableau 3** : Evolution du nombre de porcs excréteurs de *Salmonella Typhimurium* lors de l'essai sur l'ensemble des animaux inoculés.

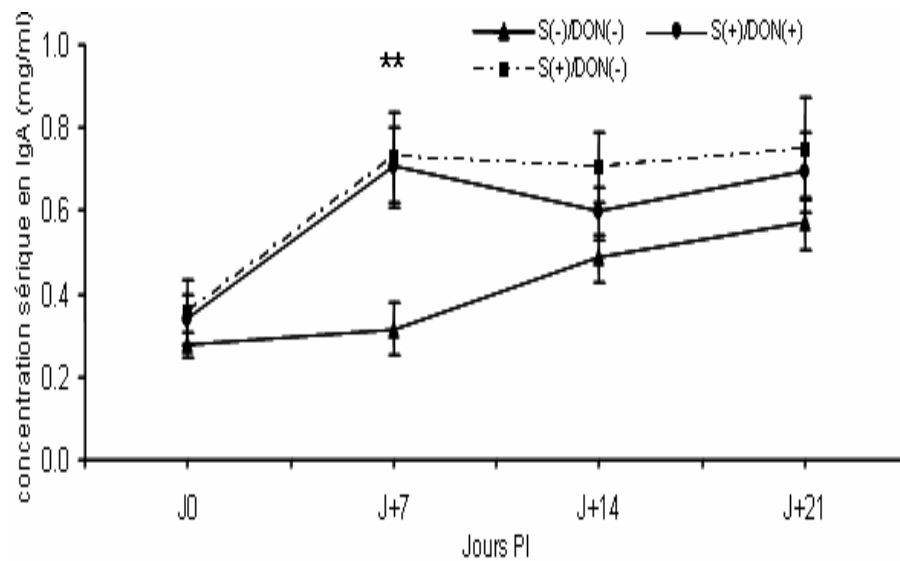
Echantillons	Concentration (UFC/g) <sup>(2)</sup>	Traitement									
		S(+)/DON(-)					S(+)/DON(+)				
		J+7 <sup>(1)</sup>	J+9	J+14	J+21	J+28	J+7	J+9	J+14	J+21	J+28
<b>Fèces (n= 6)</b>	>200	3/6 <sup>(3)</sup>	0/6	1/4	0/6	/	2/6	1/6	0/6	1/6	/
	<200	3/6	6/6	3/4	6/6	/	4/6	5/6	6/6	5/6	/
<b>Sur animaux abattus (n=6)</b>											
Ganglions mésentériques	>200		0/6			0/6		0			0/3
Cæcum	>200		2/6			3/6		4/6			2/4
Colon	>200		3/6			3/6		4/6			0/4

<sup>(1)</sup> J, nombre de jours après inoculation par *Salmonella Typhimurium*

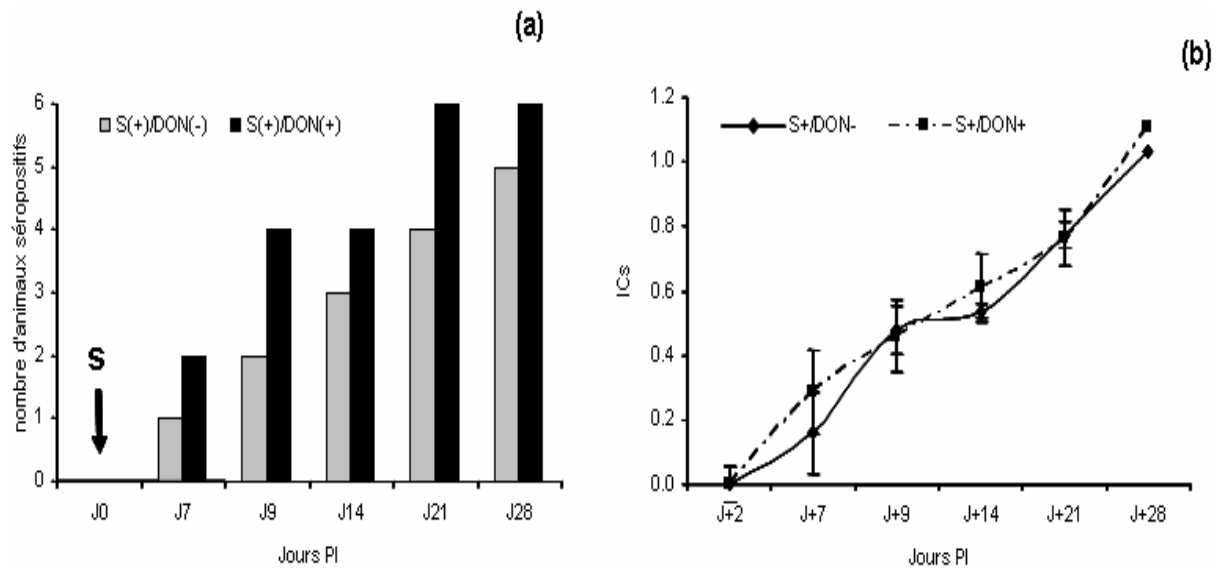
<sup>(2)</sup> Concentration établie par dénombrement (>200 UFC/g) ou par analyse Présence/absence (<200 UFC/g)

<sup>(3)</sup> Nombre d'échantillons (< ou > à 200 UFC/g) / nombre total d'échantillons positifs

Au niveau du colon, 50% des contenus des animaux recevant un aliment témoin avaient une concentration en *Salmonella Typhimurium* supérieure à 200 UFC/g en fin d'essai, alors que tous les animaux du groupe exposé au DON présentaient des concentrations inférieures au seuil de dénombrement dans leurs prélèvements. Dans les ganglions mésentériques, seuls 3 échantillons étaient encore positifs à J+28 PI dans le groupe recevant un aliment contaminé, soit 2 de moins que dans le groupe recevant un aliment sain.



**Figure 10:** Concentration sérique en IgA chez les porcs des animaux recevant un aliment contaminé 7 jours PI. Les résultats sont présentés par la moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM), et exprimés en mg/ml. \*\*: différences significatives entre les animaux inoculés et non inoculés par *Salmonella* Typhimurium ( $p < 0,01$ ).



**Figure 11 :** Evolution du nombre de séroconversion spécifique à *Salmonella* Typhimurium au cours du temps dans les groupes infectés. (a), évolution du nombre d'animaux séropositifs. (b), évolution de la concentration en anticorps dirigés contre *Salmonella* spp. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM). ICs, indice de concentration des anticorps dirigés contre *Salmonella* spp.



### *- Dénombrement des coliformes thermotolérants*

Tout au long de l'essai, les mesures effectuées chez les animaux des différents groupes ont montré un nombre de coliformes thermotolérants compris entre  $10^7$  et  $10^8$  UFC/g de fèces. Le dénombrement de la population des coliformes thermotolérants dans les fèces des porcs n'a pas montré de différences significatives de concentrations entre les groupes liées à la présence de DON dans l'aliment ou après l'inoculation des animaux par *Salmonella* Typhimurium.

### **Paramètres sérologiques**

#### *- Concentration en IgA*

Entre J+7 PI et J+28 PI, les porcs non-infectés et recevant un régime non contaminé ont présenté une augmentation quasi linéaire et significative de leur concentration sérique en IgA, passant de  $0,278 \pm 0,029$  ng/ml à  $0,570 \pm 0,060$  ng/ml en fin d'essai. Chez les porcs inoculés par *Salmonella* Typhimurium et alimentés avec un aliment contaminé ou non, la teneur en IgA était la même dans les deux lots à J+7 PI, puis supérieure à celle des porcs non infectés. Dans les 2 lots infectés, l'augmentation était significative ( $p < 0,01$ ). Chez les porcs infectés, une légère diminution a été enregistrée après l'introduction de l'aliment contaminé, sans que cette différence soit significative comparée aux autres groupes. En fin d'essai, tous les porcs inoculés, exposé au DON ou non, présentaient des concentrations en IgA plus élevée (31% et 21%, respectivement) que celle des animaux non inoculés, mais de manière non significative.

#### *Séroconversion des porcs inoculés*

Comme dans l'essai précédent, la séroconversion a été mise en évidence une semaine post-inoculation pour les porcs recevant un régime contaminé en DON et une semaine plus tard pour ceux recevant un aliment témoin (Figure 11a). Le nombre d'animaux séropositifs était également plus élevé dans le lot recevant du DON que dans l'autre groupe. Par ailleurs, tous les porcs exposés au DON étaient séropositifs trois semaines post inoculation, alors que dans l'autre lot, 5 animaux sur les 6 étaient séropositifs. Les différences apparues n'ont pu être analysées statistiquement en raison du faible nombre d'animaux. L'analyse statistique des ICs des animaux a montré que l'intensité de la séroconversion n'était pas significativement différente entre les animaux positifs des deux groupes inoculés (figure 11b).

## **Discussion :**

Chez le porc, il a été mis en évidence que le principal effet observable du DON était une baisse de consommation et du GMQ des animaux (Pestka et Smolinski, 2005; Etienne et Wache, 2008). Indépendamment de la séquence d'infection des animaux, nous retrouvons ici des effets similaires à ceux observés dans notre étude précédente (Wache *et al.*, 2009), que les animaux soient inoculés ou non par *Salmonella* Typhimurium. Les effets restent toujours transitoires et peuvent être assimilés à ceux résultant d'une restriction alimentaire modérée.

Lors de cet essai, aucun signe clinique ni pathologie caractéristique n'a été observé suite à l'infection expérimentale par *Salmonella* Typhimurium, que ce soit en présence ou en absence d'aliment contaminé. Il apparaît, comme attendu dans le cas des modèles de portage asymptomatique, que l'inoculation des animaux par une dose de  $10^6$  UFC de *Salmonella* Typhimurium n'a pas eu d'impact sur les paramètres de croissance des porcs. Aucun effet significatif synergique ou antagoniste du DON sur les paramètres zootechniques n'a été retrouvé, que le DON soit administré avant ou après l'infection. La séroconversion dans les 15 jours suivant l'infection, ainsi que la présence de *Salmonella* spp. dans les tissus de tous les porcs jusqu'à l'abattage, ont montré que l'inoculation *per os* effectuée avec une dose de  $10^6$  UFC de *Salmonella* Typhimurium permettait de reproduire un portage asymptomatique de salmonelle chez les porcs en croissance. Cette observation confirme les résultats d'une étude précédente effectuée avec les mêmes doses d'inoculation par voie orale (Tanguy *et al.*, 2006), où les auteurs n'ont pas non plus observé d'effet de cette bactérie sur les paramètres de croissance des porcs de même âge, alimentés ou non avec une alimentation contaminé en fumonisine B1.

Chez différentes espèces animales, de nombreuses études ont montré que l'ingestion d'un aliment naturellement contaminé en DON à différentes doses modulait la réponse immunitaire, provoquant notamment une élévation de la concentration sérique en IgA (Pestka et Smolinski, 2005). Chez les porcs, ces effets du DON sur la réponse immunitaire ou sur d'autres facteurs hématologiques et biochimiques ne sont cependant pas toujours mis en évidence, car ils sont largement dépendants de la dose administrée et des conditions expérimentales. En effet, certains auteurs ont constaté une augmentation de la teneur en IgA dans le sérum des porcs après administration de doses de toxine comprises entre 0,8 et 6,8 mg/kg d'aliment (Swamy *et al.*, 2002; Pinton *et al.*, 2004; Goyarts *et al.*, 2005; Accensi *et al.*,

2006; Goyarts *et al.*, 2006a), alors que d'autres n'ont observé aucune modification (Bergsjö *et al.*, 1993; Danicke *et al.*, 2004b).

Entre le premier et le dernier jour de notre étude, nous observons que la concentration en IgA augmente régulièrement et significativement dans tous les groupes d'animaux, mais cette augmentation s'est toujours révélée largement plus rapide et plus forte chez les porcs infectés expérimentalement dans la première semaine post infection quel que soit le régime alimentaire administré. Indépendamment des protocoles utilisés, aliment contaminé/infection ou infection/aliment contaminé, l'augmentation des IgA est majoritairement liée à l'inoculation des animaux par *Salmonella* Typhimurium, comme observé précédemment dans d'autres études (Letellier *et al.*, 2001; Steinbach *et al.*, 2003). Nous pouvons également souligner que la différence, même non significative, du taux d'IgA observée entre les animaux non infectés et recevant un régime alimentaire différent ne se retrouve pas chez les animaux infectés après distribution de l'aliment contaminé. Dans ce cas particulier, il semble que l'augmentation consécutive au challenge infectieux a tendance à masquer l'augmentation d'IgA liée à la mycotoxine.

Une étude de Jorgensen *et al.* (1999), réalisée chez le porc, a montré que la densité de coliformes retrouvée dans le tube digestif pouvait être un indicateur de la contamination en salmonelles chez le porc. Dans notre étude, l'inoculation des animaux par *Salmonella* Typhimurium recevant un aliment témoin n'affecte pas la concentration de coliformes fécaux, ce qui peut être mis en relation avec le modèle de portage asymptomatique de notre étude et la faible dose d'inoculation utilisée. En revanche, deux jours après infection chez les animaux exposés au DON, nous observons une diminution significative de la population des coliformes thermotolérants fécaux. Ceci semble indiquer que la flore commensale serait sensible au portage de salmonelles lorsque les animaux sont préalablement alimentés avec un aliment contaminé en DON. Cette diminution n'est cependant pas retrouvée lorsque l'aliment contaminé est distribué sept jours après l'inoculation des porcs. Ces deux éléments sont probablement liés au fait que la modification observée est immédiate et transitoire, et qu'un apport du DON sept jours post-inoculation interviendrait trop tardivement.

Bien qu'un déséquilibre de flore ait été mis en évidence en présence de DON et de salmonelles, la diminution du nombre des coliformes n'est pas liée à une augmentation de l'excrétion de *Salmonella* spp. Dans le cadre de ces travaux, les coliformes fécaux thermotolérants sont essentiellement représentés par *Escherichia coli* sous sa forme commensale. Les mécanismes de régulation de l'adhésion à la muqueuse des bactéries

intestinales commensales telle que *E. coli* sont peu décrits dans la littérature, la proportion de *E. coli* adhérentes et libres, dans le tractus d'animaux sains, reste méconnu. Cependant, la virulence des souches pathogènes telle que *Salmonella* Typhimurium est liée à ses capacités d'adhésion à la membrane de la muqueuse intestinale. Les mécanismes d'adhésion de ces 2 souches pouvant être différents, une décroissance des coliformes n'est pas forcément liée à une colonisation plus massive de la muqueuse intestinale par *Salmonella* Typhimurium. Dans l'étude précédente de cette thèse (Wache *et al.*, 2009), nous avons pu observer que le DON pouvait avoir un effet sur l'équilibre de la flore intestinale des porcs. Cette association pourrait également entraîner une altération de la muqueuse intestinale; ce point n'a pas pu être mis en évidence dans notre étude, mais mériterait d'être approfondi plus en détail dans le cadre d'études complémentaires.

En résumé, l'ensemble de nos résultats ne fait pas apparaître d'effets majeurs de l'ingestion de DON par des porcs infectés par *Salmonella* Typhimurium, mais certains points particuliers semblent malgré tout être influencés par cette alimentation contaminée. Le DON n'aggrave pas les signes cliniques en cas d'infection par *Salmonella* spp., n'a pas d'influence sur l'excrétion de salmonelles par les animaux porteurs et, ainsi qu'en témoignent les résultats sur les ganglions mésentériques, n'a que peu d'effets sur la persistance des salmonelles dans l'organisme. En revanche, les résultats enregistrés au niveau de l'intensité de la séroconversion montrent une plus grande vitesse d'apparition d'anticorps contre *Salmonella* spp. lorsque les animaux sont exposés au DON. De plus, une synergie entre le DON et *Salmonella* Typhimurium apparaît et s'est manifesté par une diminution du nombre de coliformes fécaux thermotolérants.

Par rapport à la littérature, ces résultats ne confirment pas ceux reportés dans l'étude de Hara-Kudo *et al.* (1995), qui avait observé une amplification de la sensibilité des souris BALB/c lors d'une exposition au DON à 2 mg/kg de poids vifs des animaux. Les auteurs avaient constaté une persistance de la colonisation et augmentation de la croissance des bactéries *Salmonella enteridis* dans les ganglions mésentériques, le foie et la rate. Cependant, il faut prendre en compte les différences liées à l'espèce étudiée, les sérotypes de *Salmonella* spp., et surtout à la voie d'administration et les doses de salmonelles utilisées. En effet, la dose utilisée ( $6 \times 10^5$  UFC) dans l'étude de Hara-Kudo *et al.* (1995) ne correspondait pas à un portage asymptomatique de la bactérie, mais à un modèle d'infection aiguë des animaux. Un modèle d'infection aiguë aurait probablement masqué les effets de la contamination alimentaire recherchés dans notre étude. Par contre, nos résultats sont comparables à ceux obtenus dans une précédente étude, où les auteurs n'avaient pas observé d'effet particulier

d'une autre fusariotoxine, la fumonisine B1, sur la sensibilité des porcs en phase de croissance à *Salmonella* Typhimurium lors d'un portage asymptomatique de la bactérie (Tanguy *et al.*, 2006). Dans nos travaux, le modèle de portage a permis de mettre en évidence des effets cumulés d'une contamination alimentaire et d'une infection sur la santé digestive des porcs.

## **DISCUSSION GÉNÉRALE**

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons voulu explorer différents aspects toxicologiques du DON encore méconnus chez le porc. Les études réalisées se sont déroulées suivant deux approches complémentaires, une partie *in vitro* et l'autre *in vivo*. Les différentes études étant présentées séparément sous la forme d'articles scientifiques, nous nous proposons de discuter l'ensemble de nos résultats dans ce dernier chapitre de thèse. Après un rappel des objectifs, nous considérerons tout d'abord les résultats obtenus *in vitro* sur les fonctions des cellules immunitaires étudiées, puis nous présenterons les premières observations des effets du DON chez le porc, lors des expérimentations animales. Enfin, nous discuterons des liens entre ces deux parties et des premières conclusions et perspectives à en tirer.

## **1. Rappels des objectifs**

### 1.1. Effet du DON sur les cellules phagocytaires

A ce jour, les propriétés immunotoxiques du DON sur la réponse immunitaire non spécifique et les fonctions des cellules phagocytaires sont encore peu connues chez le porc. L'effet sur l'activité des neutrophiles, par exemple, n'est pas renseigné. L'impact sur les macrophages est quant à lui mieux documenté, mais principalement chez l'Homme et la souris, et non chez le porc. De plus, aucune information n'est disponible concernant l'effet du DON sur l'expression des récepteurs membranaires impliqués dans la signalisation et la coopération cellulaire des macrophages lors d'une réaction inflammatoire. Ce manque d'information a motivé les premiers travaux de cette thèse, qui ont été d'étudier par des méthodes *in vitro*, les effets du DON sur les fonctions principales des neutrophiles et de caractériser l'impact de cette toxine sur les marqueurs de différenciation des macrophages.

### 1.2. Effet du DON sur la flore intestinale et la sensibilité aux salmonelles des porcs

Contrairement à d'autres mycotoxines, le DON est très peu métabolisé lors de son passage dans l'organisme du porc, ce qui peut expliquer la sensibilité accrue de cet animal comparé à d'autres espèces (Prelusky *et al.*, 1988; Danicke *et al.*, 2004a). Malgré ce constat, son impact sur l'équilibre de la flore intestinale n'a jamais été véritablement étudié. De plus, bien que les salmonelles soient fréquemment retrouvées dans les élevages de porcs en Europe, peu d'études *in vivo* ont tenté d'évaluer les effets liés à la présence de DON dans

l'aliment sur les animaux porteurs d'agents pathogènes. Ne provoquant pas de signe clinique observable, le portage asymptomatique de salmonelle reste pourtant une cause de contamination importante des produits d'origine porcine et constitue donc un véritable risque de santé publique. C'est pourquoi, nous avons mené des expérimentations sur des porcs en phase de croissance, afin d'évaluer les effets de l'ingestion chronique d'aliments contaminés en DON sur la flore intestinale des porcs, ainsi que sur le portage asymptomatique et l'excrétion des salmonelles.

## **2. Effets du DON sur les cellules de la réponse immunitaire non spécifique : étude *in vitro***

### 2.1. Protocole expérimental

#### *2.1.1. Le type cellulaire*

Afin d'étudier les effets du DON sur la réponse inflammatoire du porc, nous nous sommes intéressés à deux types de cellules phagocytaires : les neutrophiles et les macrophages. Ces cellules conditionnent l'efficacité de la réponse inflammatoire de part leur rapidité d'action, leurs propriétés de migration vers le site infectieux, de destruction des micro-organismes et leur capacité à alerter les autres types cellulaires du système immunitaire.

L'impact du DON sur les neutrophiles activés n'est pas connu. Parallèlement, il nous semblait pertinent d'évaluer les effets du DON sur l'expression de certains récepteurs membranaires des macrophages, récepteurs sollicités lors de l'activation de ces cellules. En effet, un récent travail expérimental a montré que le DON altérait l'expression de marqueurs de différenciation des cellules dendritiques porcines, les récepteurs du complexe majeur d'histocompatibilité class II (MHC II), CD86/80, entraînant un dérèglement des fonctions de ces cellules après stimulation par un agent pathogène (Bimczok *et al.*, 2007). Notre première étude a été réalisée sur des macrophages humains, prenant en compte le fait que l'homme et le porc montrent un haut degré de similitude au niveau de leur système immunitaire.



### 2.1.2. Les agents de stimulation

L'objectif principal de nos études *in vitro* était d'étudier les effets du DON sur l'activation des cellules phagocytaires lors d'une réaction inflammatoire. En nous reportant à la littérature scientifique, nous avons choisi d'utiliser différents agents stimulateurs, suivant le type cellulaire et les fonctions étudiés, dans le but de « mimer » de façon optimale l'activation des neutrophiles ou des macrophages lors d'une réaction inflammatoire provoquée par un agent pathogène. Ainsi, du LPS de souche bactérienne pathogène, *E. coli* 0111:B4, a été utilisé pour l'activation des neutrophiles et de l'IFN- $\gamma$  pour l'activation des macrophages (McDonald *et al.*, 1998; Schroder *et al.*, 2004). De plus, une protéine recombinante d'IL-8 a été utilisée pour tester le chimiotactisme des neutrophiles, car il représente l'un des composés les plus puissants pour attirer ces cellules vers le site inflammatoire (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Dans ce travail de thèse, les agents de stimulation choisis ont tous fortement activé les cellules étudiées, et nous ont donc permis de mettre en évidence, *in vitro*, les risques liés à la présence de DON sur la réponse du système immunitaire non spécifique à un agent pathogène.

### 2.1.3. Doses d'exposition

Afin d'évaluer les effets du DON sur les fonctions des cellules phagocytaires activées, il était important de travailler avec des doses de toxine non-cytotoxiques. Au cours des études expérimentales, nous avons montré que la viabilité des neutrophiles porcins stimulés par du LPS n'était pas affectée pour des concentrations inférieures à 50  $\mu$ M (15  $\mu$ g/ml). Takayama *et al.* (2005) ont décrit une absence de cytotoxicité du DON sur les neutrophiles de porc non stimulés pour des doses inférieures à 10  $\mu$ M (3  $\mu$ g/ml), après observation par coloration cellulaire. L'absence de test enzymatique sur la viabilité cellulaire et la non-stimulation des cellules dans leur étude peuvent expliquer la différence entre nos résultats respectifs.

Notre travail est le premier à démontrer une dose limite de cytotoxicité du DON pour des neutrophiles (concentration supérieures à 50  $\mu$ M, soit 15  $\mu$ g/ml). Selon Goyarts et Danicke (2006), les concentrations moyennes de DON retrouvées dans le plasma des porcs atteignent rarement plus de 0,044  $\mu$ g/ml, après l'ingestion chronique d'un aliment contaminé en DON à 5,7 mg/kg (ppm) d'aliment. Les doses de DON susceptibles d'être retrouvées de façon courante et en conditions naturelles dans les céréales étant généralement bien plus faible

(SCOOP, 2003), les contaminations potentielles de DON dans les aliments n'affecteraient donc pas la viabilité des neutrophiles.

Pour le cas des macrophages humains, nous n'avons pas observé de cytotoxicité particulière du DON à des doses inférieures à 5  $\mu\text{M}$  (1,5  $\mu\text{g/ml}$ ) sur l'activité métabolique mitochondriale des cellules. Nos résultats concernant les récepteurs membranaires tendent également à confirmer une absence de cytotoxicité des doses testées. En effet, le niveau d'expression de chaque récepteur membranaire sur des cellules exposées à 5  $\mu\text{M}$  (1,5  $\mu\text{g/ml}$ ) est toujours resté supérieur voir équivalent à celui observé chez des cellules non traitées.

Deux études récentes sur les cellules dendritiques de porc et de l'homme ont montré que le niveau de cytotoxicité du DON envers ces cellules était très largement comparable (Hymery *et al.*, 2006; Bimczok *et al.*, 2007). Dans ce contexte, nos résultats suggèrent que les neutrophiles sont beaucoup moins sensibles à une exposition au DON que les macrophages. Cependant, étant données les concentrations plasmatiques faibles retrouvées lors de contaminations naturelles en DON dans les aliments, celles-ci n'auraient pas non plus d'effet sur la viabilité des macrophages. Cette hypothèse reste cependant à confirmer, en raison de la différence du temps d'exposition et de la séquence d'activation des cellules étudiées.

## 2.2. Le DON diminue les capacités fonctionnelles des cellules phagocytaires

### 2.2.1. Capacité à diminuer la migration des neutrophiles et l'adhésion des macrophages (expression de CD54)

Les organismes sont souvent soumis à des agressions chroniques et répétées par divers agents pathogènes (parasites, virus, ...). Les systèmes de défense immunitaire sont alors activés et induisent des processus alliant des interactions cellulaires complexes entre les deux niveaux de la réponse immunitaire : la première dite non spécifique, rapide mais ne différenciant pas les agents pathogènes les uns des autres ; la deuxième dite spécifique, plus lente mais réagissant spécifiquement à chaque type d'agent infectieux et permettant la prévention d'une réinfection par ces agents.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à deux types cellulaires de la réponse immunitaire non spécifique, les neutrophiles et les macrophages. Les neutrophiles sont les premiers leucocytes attirés vers le site inflammatoire, suivis ensuite par les macrophages. Lors d'une stimulation par un agent phlogogène, la migration de ces deux types de cellules phagocytaires nécessite généralement le couplage entre des molécules

d'adhésions spécifiques, dont une des représentantes majeures est CD54 ou ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1).

Lors des études *in vitro* de cette thèse, nous avons mis en évidence que le DON affectait les propriétés de migration des cellules phagocytaires, à travers la diminution du chimiotactisme des neutrophiles porcins et la réponse à une activation par l'IFN- $\gamma$  des macrophages humains au niveau de la protéine membranaire, CD54. Les effets observés sont proportionnels à la dose employée pour chaque type cellulaire, et, curieusement, les cellules présentent les mêmes niveaux de diminution en fonction de leurs sensibilités respectives (environ 25 et 45 % d'inhibition à 10 et 50  $\mu$ M (3-15  $\mu$ g/ml) pour les neutrophiles et à 1 et 5  $\mu$ M (0,3-1,5  $\mu$ g/ml) pour les macrophages). De plus, nous avons démontré qu'un prétraitement des cellules par l'IFN- $\gamma$  protégeait les macrophages des effets immunotoxiques du DON et que le DON n'affecte pas l'état de base des macrophages mais induit une diminution de leur capacité à répondre à une stimulation. Vu la diminution dose-dépendante de l'expression du CD54, impliqué dans le processus de migration et d'adhésion des macrophages, il est possible que l'effet observé sur le chimiotactisme soit également une des conséquences de l'action du DON sur certaines molécules d'adhésion des neutrophiles, comme observé pour les macrophages. Cependant, il faut tenir compte du fait que la capacité de migration des leucocytes peut être différente selon le type de cellule étudié, les stimuli d'activation, le tissu et l'espèce animale considérée (Mizgerd, 2002).

Pour interpréter nos résultats, nous pouvons formuler l'hypothèse que le DON affecte la capacité de migration des neutrophiles et des macrophages en diminuant la réponse des cellules phagocytaires à une activation, via son action directe sur le métabolisme intracellulaire et sa capacité d'inhibition de synthèse des protéines.

### *2.2.2. Capacité à diminuer la signalisation et la coopération cellulaire de la réponse immunitaire non spécifique*

L'activation des leucocytes par des agents pathogènes ou des signaux intracellulaires conduit les cellules activées à surexprimer leurs récepteurs membranaires spécifiques et à libérer de façon massive certaines protéines de l'inflammation. Dans ces travaux, nous avons observé que l'exposition de DON aux doses testées des macrophages avait des effets immunotoxiques sur l'activation et la différenciation de ces cellules, à travers l'expression des récepteurs du LPS (CD14) et de l'IFN- $\gamma$  (CD119). Parallèlement, nous avons démontré que de faibles concentrations de DON (0,5 $\mu$ M à 5  $\mu$ M, soit 0,15 à 1,5  $\mu$ g/ml) pouvaient

affecter les propriétés de coopération cellulaire des cellules phagocytaires en réponse à une stimulation, par la diminution de la production des récepteurs membranaires MHC II sur les macrophages et la libération de l'IL-8 par les neutrophiles, cytokine responsable, entre autre, du recrutement d'autres leucocytes en réponse à une stimulation au LPS.

Pour les macrophages, nous avons constaté que l'effet le plus important de la toxine concernait l'expression du CD119, récepteur de l'IFN- $\gamma$ . Vu le rôle primordial de ce récepteur dans l'activation des macrophages, notamment au niveau de la surexpression des autres protéines membranaires par activation des voies de transcription, nous avons tout d'abord proposé que la diminution sur les autres marqueurs de différenciation était la conséquence directe d'une action du DON sur le récepteur CD119. Cependant, comme nous n'avons pas observé de modification de l'expression de ces différentes protéines en l'absence d'activation, nos résultats ne nous permettent pas, pour l'instant, de confirmer cette hypothèse.

Dans le chapitre I-2., nous avons observé que la diminution de la sécrétion d'IL-8 par les neutrophiles était accompagnée de l'effet antagoniste de ces deux toxines sur l'expression de la protéine p65 NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B) phosphorylée. Or, la phosphorylation de cette protéine est responsable de l'augmentation de l'expression d'IL-8 par les neutrophiles lors d'une exposition au LPS, par l'intermédiaire de son action sur les promoteurs des gènes de la cytokine (McDonald *et al.*, 1997; Cloutier *et al.*, 2007). Nous avons donc proposé que la diminution de la production d'IL-8 résulte de l'effet inhibiteur d'une co-exposition du DON et du LPS sur la voie de transcription NF- $\kappa$ B. L'implication d'autres voies de signalisation intracellulaire dans ce processus peut être envisagée, vu l'effet de doses similaires de DON sur l'expression de CD14 chez les macrophages. En effet, CD14 est également présente chez les neutrophiles (Keresztes et Lajtos, 1997) et sa liaison à d'autres récepteurs transmembranaires du LPS permet la libération et donc l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, mais aussi l'activation des voies de signalisation des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase), telles que p38, JNK1/2 (c-Jun N terminal Kinase), ERK1/2 (Extracellular Regulated Protein Kinase) (Landmann *et al.*, 2000).

En conclusion, nos résultats suggèrent que les effets du DON sur la coopération et la signalisation cellulaire lors de la réponse à un stimulus peuvent être reliés à une altération de l'activation des voies de transcription intracellulaire des neutrophiles et des macrophages. Pour le moment, nos expérimentations ne nous permettent pas d'identifier les voies métaboliques impliquées et de savoir si les diminutions observées sont dues à un effet direct ou indirect de la toxine.

### 2.3. Conséquences de la présence de DON sur la réponse immunitaire non spécifique et la sensibilité aux infections

Ces travaux montrent que le DON a des effets immunosuppresseurs sur les neutrophiles et sur les macrophages. La diminution des capacités fonctionnelles de ces cellules pourrait ainsi entraîner une augmentation de la sensibilité de l'hôte aux agents pathogènes. En effet, la diminution de la migration des neutrophiles et de leur production d'IL-8 pourrait conduire à une diminution du recrutement de ces cellules sur le site inflammatoire et engendrer ainsi une moindre élimination des agents pathogènes (Strieter *et al.*, 1992). De la même manière, la présence du DON pourrait diminuer les capacités de reconnaissance et de présentation de l'antigène des macrophages, même après une production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD4+ et les cellules NK (Natural Killer), activés par un agent pathogène (Schroder *et al.*, 2004).

Ces effets observés sont des conséquences directes de l'action du DON sur les neutrophiles et les macrophages. Cependant, une cascade de réactions indirectes sur la coopération cellulaire en découle. Pour comprendre cela, considérons une action simultanée du DON sur les deux types cellulaires étudiés, nos résultats sur les macrophages humains pouvant, à priori, être extrapolés chez le porc. Lors d'une infection par des bactéries Gram négative, l'action du LPS induit la production d'IFN- $\gamma$  par les Lymphocytes T CD4+ et les cellules NK. Ces derniers activent ensuite les macrophages par action sur leurs récepteurs membranaires tels que CD54, CD14 et MHC II, qui, à leur tour, produisent de l'IFN- $\gamma$  ainsi que d'autres cytokines comme l'IL-8, modulant ainsi les fonctions des neutrophiles et des lymphocytes T (Schroder *et al.*, 2004). Or, le DON est connu pour avoir des effets immunotoxiques sur les différents types cellulaires précités et sur la production d'IFN- $\gamma$  dans les tissus lymphatiques chez de nombreuses espèces (Pestka *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Severino *et al.*, 2006; Pinton *et al.*, 2008). Il semble donc que le DON puisse réprimer la réponse de ces cellules de la réponse immunitaire en cas d'inflammation. La diminution de la réponse immunitaire non spécifique par le DON observée dans notre étude nous apporte ainsi des informations supplémentaires quant à une possible augmentation de la sensibilité aux pathogènes des animaux, comme cela a déjà été observé chez des souris exposées au DON (Hara-Kudo *et al.*, 1995; Sugita-Konishi *et al.*, 1998).

Dans la partie II-2. de ce travail de thèse, l'absence d'effet du DON sur le portage asymptomatique de salmonelle des animaux infectés expérimentalement ne semblent pas confirmer notre hypothèse formulée à partir de ces observations *in vitro*. Avant de conclure,

il serait cependant nécessaire et très intéressant d'étudier les fonctions des cellules phagocytaires et les modes d'action du DON chez des animaux infectés avec des doses plus importantes de pathogènes et recevant un aliment contaminé en DON.

#### 2.4. Perspectives

L'utilisation de macrophages humains nous a permis de montrer que le DON diminuait la réponse à l'IFN- $\gamma$ , activateur de certains récepteurs membranaires impliqués dans les fonctions principales des cellules phagocytaires. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une étude montre des effets du DON sur des récepteurs membranaires des macrophages et ce, quelle que soit l'espèce. Une étude similaire serait à envisager sur des macrophages de porcs, en explorant en parallèle les fonctions de ces cellules et les voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la production des récepteurs membranaires. Enfin, l'emploi d'inhibiteurs du récepteur à l'IFN- $\gamma$ , CD119, nous permettrait de savoir si la diminution de la sensibilisation des macrophages par le DON résulte principalement de l'inhibition de ce récepteur, ou d'une action de la toxine sur l'ensemble des CD étudiés.

Nos résultats sur les neutrophiles suggèrent que le DON diminue la production d'IL-8 en réponse au LPS par un effet antagoniste au niveau des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B. Il serait intéressant de confirmer notre hypothèse en vérifiant d'une part, si les ARN messagers de l'IL-8 sont altérés selon les mêmes conditions expérimentales, et d'autre part si l'expression des inhibiteurs de la voie des NF- $\kappa$ B est également modulée. De plus, l'analyse des autres voies de signalisation telles que les MAPKs nous permettrait de caractériser le mode d'action général du DON sur les neutrophiles lors d'une stimulation simultanée au LPS. Bien que n'ayant pas observé d'altérations de la phagocytose d'*E. coli* pathogène par les neutrophiles, l'analyse de la production des composés oxygénés impliqués dans la destruction des microorganismes pathogènes serait un plus à la caractérisation des effets de la toxine sur les neutrophiles de porcs. Enfin, une étude récente a montré que *Salmonella* Typhimurium est capable de moduler l'expression des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B dans les ganglions mésentériques des porcs, lui permettant ainsi de coloniser plus rapidement l'organisme des animaux (Wang *et al.*, 2007). Vus les résultats obtenus sur les neutrophiles dans notre étude *in vitro*, l'analyse de l'expression des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B chez les cellules phagocytaires prélevées sur des porcs exposés au DON et infectés par *Salmonella* Typhimurium nous permettrait d'aller plus en avant sur la caractérisation des modes d'actions du DON.

### **3. Effet du DON sur la flore intestinale et le portage de *Salmonella* Typhimurium : étude *in vivo***

#### 3.1. Protocole expérimental

##### *3.1.1. Dose d'exposition au DON*

Au cours de nos expérimentations *in vivo*, nous avons choisi d'étudier les effets d'une intoxication chronique de DON chez des porcs infectés ou non par *Salmonella* Typhimurium avec une dose de toxine relativement peu élevée, mais représentative des teneurs susceptibles d'être retrouvées couramment sur le terrain. En effet, les recommandations de la Commission Européenne du 17 août 2006 fixent un seuil de DON dans les aliments finis de 0,9 mg/kg, mais il n'est pas rare de retrouver des lots de céréales chez les producteurs de porcs comportant des teneurs en DON plus élevées. De plus, il nous semblait important de pouvoir comparer nos résultats sur les paramètres enregistrés avec ceux déjà mentionnés dans d'autres études, utilisant les mêmes conditions d'alimentation (Rotter *et al.*, 1994; Grosjean *et al.*, 2003; Pinton *et al.*, 2008). Dans ce contexte, nous avons choisi de travailler avec une dose de toxine approchant les 3 mg/kg d'aliment (ppm).

##### *3.1.2. Aliment*

Afin de se rapprocher le plus possible des conditions de terrains, nous avons fait le choix d'utiliser un aliment naturellement contaminé en DON. Un des problèmes majeurs rencontrés dans cette étude a été la difficulté de trouver un blé présentant une dose de DON supérieur à 4 ppm, et ne contenant pas de teneur élevée d'autres mycotoxines. Finalement, l'aliment préparé avait une teneur en DON de 2,7 ppm, des teneurs relativement faibles en ZEA et en NIV (0,225 et 0,075 ppm, respectivement), et les autres mycotoxines recherchées (Trichothécènes A et B, Fumonisine B1 et Ochratoxine A) n'ont pas été détectées dans l'aliment administré aux animaux. Dans nos études, il est à noter qu'aucun signe clinique ou effet particulier pouvant être relié aux faibles taux de zéaralène (Tableau 1) n'a été observé (Zinedine *et al.*, 2007).

### 3.1.3. Echantillonnage

Pour des raisons bien évidentes, les analyses bactériologiques ont été réalisées sur des échantillons de fécès, l'étude hebdomadaire des contenus intestinaux se révélant impossible vu le nombre d'animaux utilisés dans nos études. Bien que le métabolisme et la proportion de bactéries diffèrent selon les différents compartiments du tube digestif, il est admis que la plupart des bactéries viables et non viables de la flore commensale des intestins se retrouvent dans les fécès et sont détectable par méthode moléculaire (Mai et Morris, 2004; Ott *et al.*, 2004). Le but étant de trouver des marqueurs bactériologiques de la santé digestive des porcs, l'emploi de fécès nous a tout de même permis de caractériser certains effets du DON, mais l'analyse des contenus intestinaux et leurs comparaisons avec les profils de flores des fécès obtenus dans notre étude nous permettrait de confirmer nos résultats.

### 3.1.4. Modèle animal

Nous avons choisi de travailler avec des porcs de 9 semaines d'âge, en phase de croissance, moment pendant lequel apparaissent généralement les infections par *Salmonella* spp. sur le terrain. Il était important de pouvoir s'affranchir au maximum des variabilités interindividuelles des animaux. Or, de nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer la composition de la flore intestinale et ainsi de masquer potentiellement les effets du DON sur celle-ci. En effet, l'âge des animaux joue sur la composition de la flore digestive, notamment lors du sevrage des porcelets (Simpson *et al.*, 2000; Hopkins *et al.*, 2001). De plus, l'utilisation de porcs EOPS a sûrement eu une influence sur l'intensité et l'homogénéité de nos résultats. Les conditions d'expérimentation de notre étude étant bien standardisées, les animaux ont été gardés dans un environnement contrôlé (température constante, atmosphère pressurisée) et à l'abri de toutes infections supplémentaires. Enfin, le nombre d'animaux a été un facteur déterminant pour les analyses des résultats. Ainsi, l'utilisation de 6 à 12 animaux par traitement nous a permis de montrer des effets significatifs du DON sur la flore intestinale à l'aide d'un modèle d'analyse statistique élaboré dans notre laboratoire.

### 3.1.5. Modèle infectieux

L'objectif de notre modèle d'infection était de montrer dans quelle mesure l'ingestion d'une alimentation naturellement contaminée en DON pouvait influencer sur l'excrétion et le



portage asymptomatique des salmonelles chez le porc. Une enquête épidémiologique a montré qu'en Bretagne, 36,2% des lots de porcs en élevage étaient excréteurs de salmonelles, augmentant ainsi les risques de contamination des produits d'origine porcine (Fablet *et al.*, 2003). De plus, un modèle d'infection pathologique (dose plus élevée en salmonelles ou souches plus pathogènes) aurait pu masquer les effets liés à la contamination alimentaire des animaux. C'est pourquoi nous avons choisi de travailler avec un modèle de portage asymptomatique de *Salmonella enterica* Typhimurium, sérotype le plus répandu en Europe à l'heure actuelle (Boyen *et al.*, 2008). Enfin, l'utilisation de ce modèle nous a permis de comparer nos observations avec celles d'une autre étude réalisée récemment au sein de l'AFSSA – Ploufragan, concernant les effets d'une autre fusariotoxine, la fumonisine B1, sur le portage asymptomatique de *Salmonella* Typhimurium.

### 3.2. Effet du DON sur la flore intestinale et sur le portage de salmonelles

#### 3.2.1. Cas d'une intoxication des animaux par le DON

Indépendamment de la présence de *Salmonella* Typhimurium ou de la chronologie d'infection, nous avons observé que tous les porcs recevant un aliment contaminé en DON présentaient une diminution nette, mais transitoire, de leurs paramètres de croissance pendant une période de 7 jours environ suivant la distribution de l'aliment contaminé. Nos résultats sont sur ce point en accord avec d'autres études concernant cette mycotoxine, qui mettent également en évidence un effet passager du DON, du moins quand celui-ci est distribué à des doses inférieures à 4 ppm (Bergsjö *et al.*, 1993; Alm *et al.*, 2006). Cependant, la concentration sérique en IgA des animaux recevant un aliment contaminé en DON n'a jamais augmenté significativement comparé aux animaux recevant un aliment non contaminé, alors que l'élévation de cette concentration est considérée comme un indicateur d'une intoxication par le DON. En utilisant un protocole d'exposition à de plus fortes doses (3,9 mg/kg d'aliment), Bergsjö *et al.* (1993) n'ont pas constaté non plus de différence du niveau d'IgA dans le sérum des animaux recevant un aliment contaminé, et ce malgré une importante diminution des paramètres de croissance des animaux durant les 5 semaines de l'essai. Notre protocole expérimental a donc confirmé qu'une dose de 2,7 mg/kg d'aliment de DON dans l'aliment entraînait un effet direct, mais transitoire, sur les performances zootechniques des porcs, sans signe clinique apparent de maladie. Comme le montrent nos résultats, les paramètres de croissance des animaux sont également modulés par une certaine

accoutumance des animaux au DON, qui semble souvent la règle, du moins quand le DON est administré seul et en quantité modérée.

### *3.2.2. Le DON peut altérer l'équilibre de la flore intestinale des porcs*

Dans nos études, aucun effet véritable du DON sur les différentes populations bactériennes recherchées n'a pu être mis en évidence par les méthodes de bactériologie classique. Nous avons cependant montré que la présence simultanée de DON et de *Salmonella* Typhimurium chez les animaux diminuait le nombre de coliformes thermotolérants deux jours après l'infection des porcs, et ce seulement dans le cas d'une infection postérieure à la distribution de l'aliment contaminé. Ce point doit être mis en relation avec le fait que les méthodes de bactériologie classique ne permettent d'appréhender que les populations dominantes cultivables et non la totalité des espèces microbiennes. La technique CE-SSCP (Capillary Electrophoresis Single-Stranded Conformation Polymorphism) détecte une plus grande diversité microbienne que les techniques culturales classiques (Tannock *et al.*, 2000). Son utilisation nous a permis de mettre en évidence certaines modifications de la microflore intestinale chez les porcs, après un mois de consommation d'un aliment contaminé en DON à 2,7 mg/kg d'aliment. Ces résultats démontrent que le DON a un effet sur l'équilibre de la flore intestinale des porcs. Nous pouvons également conclure qu'une méthode de biologie moléculaire telle que la CE-SSCP semble être un atout supplémentaire pour la caractérisation des effets d'une intoxication au DON des porcs.

### *3.2.3. L'ingestion d'une alimentation au DON n'aggrave pas l'excrétion de salmonelles*

On aurait pu penser que la baisse significative et immédiate du nombre de coliformes thermotolérants observée après l'infection expérimentale s'accompagnerait d'une colonisation plus massive du tractus digestif par les salmonelles, et d'une excrétion plus forte, chez les animaux recevant un aliment contaminé (Jorgensen *et al.*, 1999). Nos résultats ne nous permettent pas de conclure en ce sens, quelle que soit la chronologie d'introduction d'aliment contaminé par rapport à l'inoculation des porcs. En revanche, il est intéressant de noter que la présence de DON dans l'aliment entraîne une variabilité plus faible des résultats

concernant la présence et/ou la persistance de *Salmonella* Typhimurium chez les animaux, comme en témoignent la séroconversion plus rapide des animaux exposés à la toxine.

L'exposition du DON n'a pas provoqué de signes cliniques chez les porcs infectés par *Salmonella* Typhimurium. A l'inverse, chez la souris, certaines études ont mis en évidence une hypersensibilité des animaux infectés par *Salmonella* spp. lors d'une exposition à différentes doses de DON. Hara-Kudo *et al.* (1995) ont montré que l'administration orale de DON de 2 mg/kg PV à des souris BALB/c, 2 semaines avant une inoculation de *Salmonella enteridis* favorisait la multiplication de la bactérie dans les ganglions mésentériques et le foie des animaux. Dans une autre étude utilisant un protocole similaire, une diminution de la résistance des souris face à cette bactérie a également été observée, alors que l'exposition de DON à 3 mg/kg PV provoquait une augmentation de la mortalité des souris (Sugita-Konishi *et al.*, 1998). Sur la base de la consommation hydrique des animaux, les auteurs ont calculé que les premiers effets observés apparaissaient avec une ingestion journalière de 0,12 mg/kg de poids vif des animaux. Si nous reportons ce même calcul pour notre étude, en considérant la consommation journalière des porcs sur les 4 semaines de l'essai, nous retrouvons une dose similaire de consommation journalière (0,15 mg/kg PV) sur l'ensemble de l'essai. Même si la comparaison avec un modèle murin reste difficile, il est possible d'imaginer que l'administration d'une dose de DON plus élevée pourrait entraîner des effets plus importants chez des animaux infectés par *Salmonella* Typhimurium. D'autres modèles infectieux avec des doses plus élevées en pathogènes, tels qu'un modèle pathologique, pourraient être également envisagé dans des expérimentations ultérieures.

### 3.3. Perspectives

#### 3.3.1. Approfondir les aspects descriptifs et fonctionnels des effets observés

Dans la première partie de ces travaux « *in vivo* », nous avons montré que l'ingestion de DON à 2,7 mg/kg d'aliment pouvait entraîner une modification des profils de flore intestinale chez les porcs. Il pourrait être intéressant de confirmer si, comme cela semble être le cas dans cette étude, l'association d'une infection par *Salmonella* et l'ingestion de DON peut perturber la flore intestinale à différents niveaux du tube digestif des animaux. A cet égard, les techniques de biologie moléculaire comme la CE-SSCP sont certainement des voies intéressantes à développer. En parallèle, il serait intéressant de pouvoir identifier les populations bactériennes impliquées dans le déséquilibre de flore, à l'aide d'autres techniques

de biologie moléculaire sur gel, qui ont déjà été utilisées dans d'autres études pour la caractérisation de la flore intestinale de porc (Simpson *et al.*, 2000).

De plus, il a été montré qu'une autre fusariotoxine peut moduler la colonisation du tube digestif des porcs par des bactéries *E. coli* pathogène (Oswald *et al.*, 2003), et que l'exposition à certaines mycotoxines, dont le DON, entraîne des réactions inflammatoires au niveau des cellules épithéliales de l'intestin (Bouhet et Oswald, 2005). L'étude de certains paramètres immunologiques et histologiques des cellules épithéliales, ainsi que celle des récepteurs spécifiques à *Salmonella* Typhimurium au niveau des différents compartiments du tractus digestif permettrait probablement de caractériser plus précisément les mécanismes liés à la toxicité du DON.

### 3.3.2. Conditions « terrains »

Les animaux en élevage sont soumis à différents facteurs exogènes qui pourraient moduler l'interprétation des résultats observés. De plus, si l'infection par un agent pathogène reste toujours un élément essentiel, il faut souligner que d'autres éléments interviennent dans un processus infectieux, dont certains sont en relation directe avec l'alimentation. Il faut également considérer que le stress alimentaire est d'autant plus fort qu'il est brutal et discontinu. Comme nous l'avons décrit précédemment dans ces essais, les porcs EOPS recevaient un aliment contaminé bien homogénéisé et de manière régulière et uniforme. Ces conditions ont certainement entraîné une accoutumance des animaux. En conditions d'élevage industriel ou conventionnel, la teneur en mycotoxine de l'aliment est beaucoup plus hétérogène et les doses de mycotoxine ingérées par les animaux sont alors beaucoup plus variables. Un essai de toxicité aiguë causée par une forte dose de mycotoxine lors d'une infection par des salmonelles serait donc intéressant à envisager. Cependant, en condition terrain, le nombre d'animaux étudiés devra être plus élevé, la variabilité interindividuelle étant plus importante. Parallèlement, il est important de noter que les lots de céréales utilisés dans les élevages porcins présentent souvent une multi-contamination en mycotoxines, provenant de la même souche fongique ou non, et capables d'apparaître sous les mêmes conditions climatiques. Cependant, il existe encore très peu d'études concernant les effets d'une alimentation multi-contaminée, et les effets de la présence simultanée de différentes mycotoxines ne sont pas encore bien connus.

#### 4. Perspectives: relation entre les essais *in vitro* / *in vivo*

Dans le premier chapitre de ce travail de thèse, nous avons montré que le DON a des effets immunotoxiques sur les cellules phagocytaires des porcs pour des concentrations de toxine de l'ordre de 0,15 à 15 µg/ml, suivant la cellule étudiée. Nous avons donc suggéré que le DON, par son action sur le système immunitaire, pourrait entraîner une sensibilité accrue des porcs lors d'une infection par un pathogène. Les résultats observés par les essais *in vivo* semblent confirmer que l'ingestion d'un aliment contaminé en DON à 2,7 ppm ne permettrait pas de retrouver des concentrations suffisantes de DON dans le plasma ou les tissus qui présenteraient des effets toxiques sur la réponse immunitaire non spécifique des porcs en cas d'infection. En effet, la contamination testée n'a pas eu de conséquences sur l'excrétion et la durée de portage de *Salmonella* Typhimurium. Cependant, notre hypothèse pourrait être éprouvée expérimentalement en étudiant les fonctions des cellules phagocytaires de l'immunité non spécifique, prélevées chez des porcs ayant ingéré différentes doses de DON et inoculés par *Salmonella* Typhimurium, tout en mesurant les concentrations de DON retrouvées dans le plasma et les tissus sur des laps de temps court (quelques heures). En effet, *Salmonella* Typhimurium peut être retrouvée dans les tissus moins de 2 heures après son inoculation chez des porcs (Reed *et al.*, 1986).

Dans ce travail, nous avons choisi délibérément un modèle de portage asymptomatique de la bactérie. Il serait également intéressant de tester d'autres souches ou espèces à différentes doses, afin de déterminer plus précisément les doses de toxines ayant un effet sur l'infection et l'excrétion de pathogènes. L'absence d'effet synergique entre le DON et *Salmonella* Typhimurium ne signifie pas forcément que le DON n'augmente pas la sensibilité envers d'autres sérotypes de la même espèce de salmonelle ou envers d'autre pathogènes, et bien évidemment, le modèle de portage reste déterminant.

Par ailleurs, les effets du DON sur les performances et sur l'équilibre de la flore intestinale ont été mis en évidence dans ce travail de thèse, mais les conséquences de ce déséquilibre de flore restent à déterminer. Les mécanismes induits par la présence de DON liés à cette modification de l'écosystème intestinal sont encore méconnus. Les conséquences de ces changements sur la colonisation du tube digestif par les pathogènes et sur la réponse immunitaire locale font l'objet, aujourd'hui, d'une recherche accrue dans le cadre plus général de l'étude des interactions hôte/pathogènes, et des relations structure/fonction du tractus digestif. Sur les futures études envisagées concernant l'influence d'une alimentation

contaminée en mycotoxine sur la sensibilité aux pathogènes, il sera donc indispensable de prévoir des études histologiques des diverses sections du tractus digestif, en complément de l'étude des paramètres immunitaires de la réponse immunitaire locale et des analyses de flore intestinale.

# CONCLUSIONS

La connaissance et l'évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les aliments des animaux de rente sont des éléments essentiels pour lutter contre les effets toxiques de ces contaminants naturels. Les travaux réalisés dans ce travail de thèse avaient pour objectif d'apporter de nouvelles données sur les effets toxiques du DON chez les porcs, notamment en relation avec une infection par un pathogène. Nos approches originales tant au niveau technique que scientifique nous ont permis de mettre en évidence des propriétés toxiques du DON non encore mise en évidence jusqu'alors.

Au cours de nos études en laboratoire, nous avons démontré que les cellules du système immunitaire non spécifique sont des cibles du DON. La propriété de cette toxine à diminuer les capacités fonctionnelles des cellules immunitaires pourrait contribuer largement à l'altération des systèmes de défense de l'organisme mis en jeu lors de réactions inflammatoires. Nos résultats permettent donc d'aller plus en avant dans l'hypothèse selon laquelle un organisme humain ou animal, exposé au DON dans des quantités non négligeable, serait plus vulnérable face à des agents biologiques pathogènes de l'environnement. Des travaux complémentaires utilisant d'autres pathogènes, des doses plus importantes de salmonelles ou de DON dans l'aliment demandent encore à être poursuivis, afin de conclure plus précisément sur le rôle de cette toxine comme facteur aggravant des infections du porc.

Le travail de thèse a mis en évidence des modifications de l'équilibre de la flore intestinale des animaux sains exposés avec une dose modérée de DON. Ces observations améliorent nos connaissances sur les effets de cette toxine chez le porc, et pose la question de l'impact d'une ingestion de forte dose de DON lors d'intoxication aiguë. Sur un plan technique, l'utilisation de nouvelles méthodes moléculaires pourrait être un outil de diagnostic supplémentaire pour l'identification de l'intoxication des porcs par le DON.

En conclusion, le DON ne semble pas augmenter la sensibilité des porcs à une infection, ni accroître l'excrétion de salmonelles lors d'une infection expérimentale modérée ou en cas de portage asymptomatique de salmonelles. Cependant, la prise en compte des aspects multifactoriels du « terrain » ainsi que nos observations sur les effets toxiques sur la réponse immunitaire locale et sur les effets même transitoires sur la prise alimentaire et les performances zootechniques, sont autant d'éléments qui ne vont pas dans le sens d'une innocuité du DON et qui nous amènent tout de même à nous interroger sur les effets éventuels d'autres pathogènes plus virulent ou de doses de toxine plus importante ou surtout plus fluctuante dans l'alimentation des animaux.



## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**Liste des références bibliographiques inclus dans les parties non traitées sous forme de revues ou d'articles scientifiques.**

**A**

- Accensi, F., Pinton, P., Callu, P., Abella-Bourges, N., Guelfi, J.F., Grosjean, F. and Oswald, I.P. **2006**. Ingestion of low doses of deoxynivalenol does not affect hematological, biochemical, or immune responses of piglets. *J. Anim. Sci.*, 84(7): 1935-42.
- Alm, H., Brussow, K.P., Torner, H., Vanselow, J., Tomek, W., Danicke, S. and Tiemann, U. **2006**. Influence of Fusarium-toxin contaminated feed on initial quality and meiotic competence of gilt oocytes. *Reprod. Toxicol.*, 22(1): 44-50.
- Azcona-Olivera, J.I., Ouyang, Y., Murtha, J., Chu, F.S. and Pestka, J.J. **1995**. Induction of cytokine mRNAs in mice after oral exposure to the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol): relationship to toxin distribution and protein synthesis inhibition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 133(1): 109-20.
- Barber, D.A., Bahnson, P.B., Isaacson, R., Jones, C.J. and Weigel, R.M. **2002**. Distribution of Salmonella in swine production ecosystems. *J. Food Prot.*, 65(12): 1861-8.

**B**

- Bergsjö, B., Langseth, W., Nafstad, I., Jansen, J.H. and Larsen, H.J. **1993**. The effects of naturally deoxynivalenol-contaminated oats on the clinical condition, blood parameters, performance and carcass composition of growing pigs. *Vet. Res. Commun.*, 17(4): 283-94.
- Bhat, R.V., Beedu, S.R., Ramakrishna, Y. and Munshi, K.L. **1989**. Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat production in Kashmir Valley, India. *Lancet.*, 1(8628): 35-7.
- Bimczok, D., Doll, S., Rau, H., Goyarts, T., Wundrack, N., Naumann, M., Danicke, S. and Rothkotter, H.J. **2007**. The Fusarium toxin deoxynivalenol disrupts phenotype and function of monocyte-derived dendritic cells in vivo and in vitro. *Immunobiology*, 212(8): 655-66.
- Bouhet, S., Le Dorze, E., Peres, S., Fairbrother, J.M. and Oswald, I.P. **2006**. Mycotoxin fumonisin B1 selectively down-regulates the basal IL-8 expression in pig intestine: in vivo and in vitro studies. *Food Chem. Toxicol.*, 44(10): 1768-73.
- Bouhet, S. and Oswald, I.P. **2005**. The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 108(1-2): 199-209.
- Boyen, F., Haesebrouck, F., Maes, D., Van Immerseel, F., Ducatelle, R. and Pasmans, F. **2008**. Non-typhoidal Salmonella infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Vet. Microbiol.*, 130(1-2): 1-19.

## C

- CAST, Ed. **2003**. *Mycotoxins: Risks in plant, Animal, and Human Systems*. Task Force report No. 139. Ames, Iowa, USA.
- Chung, Y.J., Zhou, H.R. and Pestka, J.J. **2003**. Transcriptional and posttranscriptional roles for p38 mitogen-activated protein kinase in upregulation of TNF-alpha expression by deoxynivalenol (vomitoxin). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 193(2): 188-201.
- Cloutier, A., Ear, T., Blais-Charron, E., Dubois, C.M. and McDonald, P.P. **2007**. Differential involvement of NF-kappaB and MAP kinase pathways in the generation of inflammatory cytokines by human neutrophils. *J. leukoc. Biol.*, 81(2): 567-77.
- Cote, L.M., Beasley, V.R., Bratich, P.M., Swanson, S.P., Shivaprasad, H.L. and Buck, W.B. **1985**. Sex-related reduced weight gains in growing swine fed diets containing deoxynivalenol. *J. Anim. Sci.*, 61(4): 942-50.

## D

- Danicke, S., Valenta, H. and Doll, S. **2004a**. On the toxicokinetics and the metabolism of deoxynivalenol (DON) in the pig. *Arch. Anim. Nutr.*, 58(2): 169-80.
- Danicke, S., Valenta, H., Klobasa, F., Doll, S., Ganter, M. and Flachowsky, G. **2004b**. Effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated wheat in diets for fattening pigs on growth performance, nutrient digestibility, deoxynivalenol balance and clinical serum characteristics. *Arch. Anim. Nutr.*, 58(1): 1-17.
- Davies, P.R., Bovee, F.G., Funk, J.A., Morrow, W.E., Jones, F.T. and Deen, J. **1998**. Isolation of Salmonella serotypes from feces of pigs raised in a multiple-site production system. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 212(12): 1925-9.

## E

- Ehrlich, K.C. and Daigle, K.W. **1987**. Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12,13-epoxytrichothecenes. *Biochim. Biophys. Acta*, 923(2): 206-13.
- Eriksen, G.S., Pettersson, H., Johnsen, K. and Lindberg, J.E. **2002**. Transformation of trichothecenes in ileal digesta and faeces from pigs. *Arch. Tierernahr.*, 56(4): 263-74.
- Eriksen, G.S., Pettersson, H. and Lindberg, J.E. **2003**. Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs. *Arch. Tierernahr.*, 57(5): 335-45.
- Etienne, M. and Wache, Y. **2008**. Biological and physiological effects of deoxynivalenol (DON) in the pig. *Mycotoxins in Farm Animals*. Oswald, I.P. and Taranu, I. Kerala, India, Research Signpost: 113-130.

## F

- Fablet, C., Beloeil, P.A., Fravalo, P., Jolly, J.P., Eveno, E., Hascoet, Y., Salvat, G. and Madec, F. **2003**. Etude des circonstances associées à l'excretion de *Salmonella enterica* par les porcs en croissance. *Journées Rech. Porcine*, 35: 401-408.
- Fink-Gremmels, J. **1999**. Mycotoxins: their implications for human and animal health. *Vet Q*, 21(4): 115-20.
- Forsell, J.H., Jensen, R., Tai, J.H., Witt, M., Lin, W.S. and Pestka, J.J. **1987**. Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol (vomitoxin) and 15-acetyldeoxynivalenol in the B6C3F1 mouse. *Food. Chem. Toxicol.*, 25(2): 155-62.
- Forsell, J.H., Witt, M.F., Tai, J.H., Jensen, R. and Pestka, J.J. **1986**. Effects of 8-week exposure of the B6C3F1 mouse to dietary deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. *Food Chem. Toxicol.*, 24(3): 213-9.
- Fravalo, P., Beloeil, P., Fablet, C., Hascoet, Y., Salvat, G. and Madec, F. **2002**. Risk factors of *Salmonella* excretion by finishing pigs. *Salmonella and Salmonellosis*: 282-289.
- Fukata, T., Sasai, K., Baba, E. and Arakawa, A. **1996**. Effect of ochratoxin A on *Salmonella typhimurium*-challenged layer chickens. *Avian Dis.*, 40(4): 924-6.

## G

- Goyarts, T. and Danicke, S. **2006**. Bioavailability of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig. *Toxicol. Lett.*, 163(3): 171-82.
- Goyarts, T., Danicke, S., Rothkotter, H.J., Spilke, J., Tiemann, U. and Schollenberger, M. **2005**. On the effects of a chronic deoxynivalenol intoxication on performance, haematological and serum parameters of pigs when diets are offered either for ad libitum consumption or fed restrictively. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 52(6): 305-14.
- Goyarts, T., Danicke, S., Tiemann, U. and Rothkotter, H.J. **2006a**. Effect of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) on IgA, IgM and IgG concentrations and proliferation of porcine blood lymphocytes. *Toxicol. In Vitro*, 20(6): 858-67.
- Goyarts, T., Grove, N. and Danicke, S. **2006b**. Effects of the Fusarium toxin deoxynivalenol from naturally contaminated wheat given subchronically or as one single dose on the in vivo protein synthesis of peripheral blood lymphocytes and plasma proteins in the pig. *Food Chem. Toxicol.*, 44(12): 1953-65.
- Gray, J.S. and Pestka, J.J. **2007**. Transcriptional regulation of deoxynivalenol-induced IL-8 expression in human monocytes. *Toxicol. Sci.*, 99(2): 502-11.
- Grosjean, F., Callu, P., Pinton, P., Skiba, F., Barrier-Guillot, B. and Oswald, I. **2003**. Quantification des effets de la consommation de deoxynivalenol (DON) par le porcelet sevré. *Journées Rech. Porcine*, 35: 443-450.

## H

- Hara-Kudo, Y., Sugita-Konishi, Y., Fumiko, K. and Kumagai, S. **1995**. Effects of deoxynivalenol on *Salmonella enteridis* infection. *Mycotoxins*, 42: 51-55.
- Harvey, R.B., Edrington, T.S., Kubena, L.F., Elissalde, M.H., Casper, H.H., Rottinghaus, G.E. and Turk, J.R. **1996**. Effects of dietary fumonisin B1-containing culture material, deoxynivalenol-contaminated wheat, or their combination on growing barrows. *Am. J. Vet. Res.*, 57(12): 1790-4.
- He, P., Young, L.G., Forsberg, C., **1992**. Microbial transformation of deoxynivalenol (vomitoxin). *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3857-3863.
- Hopkins, M.J., Sharp, R. and Macfarlane, G.T. **2001**. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut*, 48(2): 198-205.
- Hopwood, D.E., Pethick, D.W. and Hampson, D.J. **2002**. Increasing the viscosity of the intestinal contents stimulates proliferation of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Brachyspira pilosicoli* in weaner pigs. *Br. J. Nutr.*, 88(5): 523-32.
- Hymery, N., Sibiril, Y. and Parent-Massin, D. **2006**. *In vitro* effects of trichothecenes on human dendritic cells. *Toxicol. In Vitro*, 20(6): 899-909.

## I

- IARC **1993**. Toxins derived from *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. Crookwellense*: zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol and fusarenone X. - IARC. *Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, 56: 397-444.
- Iordanov, M.S., Pribnow, D., Magun, J.L., Dinh, T.H., Pearson, J.A., Chen, S.L. and Magun, B.E. **1997**. Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. *Mol. Cell Biol.*, 17(6): 3373-81.
- Islam, Z., Gray, J.S. and Pestka, J.J. **2006**. p38 Mitogen-activated protein kinase mediates IL-8 induction by the ribotoxin deoxynivalenol in human monocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 213(3): 235-44.
- Islam, Z., King, L.E., Fraker, P.J. and Pestka, J.J. **2003**. Differential induction of glucocorticoid-dependent apoptosis in murine lymphoid subpopulations in vivo following coexposure to lipopolysaccharide and vomitoxin (deoxynivalenol). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 187(2): 69-79.
- Islam, Z., Moon, Y.S., Zhou, H.R., King, L.E., Fraker, P.J. and Pestka, J.J. **2002**. Endotoxin potentiation of trichothecene-induced lymphocyte apoptosis is mediated by up-regulation of glucocorticoids. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 180(1): 43-55.

Iverson, F., Armstrong, C., Nera, E., Truelove, J., Fernie, S., Scott, P., Stapley, R., Hayward, S. and Gunner, S. **1995**. Chronic feeding study of deoxynivalenol in B6C3F1 male and female mice. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 15(6): 283-306.

## J

JECFA (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives). *Discussion paper on deoxynivalenol*. 38<sup>th</sup> session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants, Beijing, China, 16-20 April **2007**.

Jia, Q., Zhou, H.R., Shi, Y. and Pestka, J.J. **2006**. Docosahexaenoic acid consumption inhibits deoxynivalenol-induced CREB/ATF1 activation and IL-6 gene transcription in mouse macrophages. *J. Nutr.*, 136(2): 366-72.

Jorgensen, L., Dahl, J., Jensen, B.B. and Poulsen, H.D. **1999**. Effects of expanding, pelleting, and grinding on *Salmonella typhimurium* infection, growth performance and gastrointestinal ecosystem in slaughter pigs. *Publication no. 426*. Production, T.N.C.f.P.B.H.a. Copenhagen, Denmark.

## K

Keresztes, M. and Lajtos, Z. **1997**. Major laminin-binding and F-actin-linked glycoproteins of neutrophils. *Cell Biol. Int.*, 21(9): 543-50.

Kinser, S., Jia, Q., Li, M., Laughter, A., Cornwell, P., Corton, J.C. and Pestka, J. **2004**. Gene expression profiling in spleens of deoxynivalenol-exposed mice: immediate early genes as primary targets. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 67(18): 1423-41.

Knasmuller, S., Bresgen, N., Kassie, F., Mersch-Sundermann, V., Gelderblom, W., Zohrer, E. and Eckl, P.M. **1997**. Genotoxic effects of three Fusarium mycotoxins, fumonisin B1, moniliformin and vomitoxin in bacteria and in primary cultures of rat hepatocytes. *Mutat. Res.*, 391(1-2): 39-48.

Kollarczik, B., Gareis, M. and Hanelt, M. **1994**. In vitro transformation of the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone by the normal gut microflora of pigs. *Nat. Toxins*, 2(3): 105-10.

## L

Landmann, R., Muller, B. and Zimmerli, W. **2000**. CD14, new aspects of ligand and signal diversity. *Microbes Infect.*, 2(3): 295-304.

Leonov, A.N. **1977**. Current view of the chemical nature of factors responsible for alimentary toxic aleukia. *Mycotoxin in human and animal health*. Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W. and Mehlman, M.A. Park Forest South, Illinois, Pathotox Publishers: 323-328.

Letellier, A., Messier, S., Lessard, L., Chenier, S. and Quessy, S. **2001**. Host response to various treatments to reduce Salmonella infections in swine. *Can. J. Vet. Res.*, 65(3): 168-72.

Li, M., Cuff, C.F. and Pestka, J. **2005**. Modulation of murine host response to enteric reovirus infection by the trichothecene deoxynivalenol. *Toxicol. Sci.*, 87(1): 134-45.

## M

Mai, V. and Morris, J.G., Jr. **2004**. Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age. *J. Nutr.*, 134(2): 459-64.

Marpegan, M.R., Perfumo, C.J., Godoy, H.M., Sala de Miguel, M., Diaz, E. and Risso, M.A. **1988**. Feed refusal of pigs caused by *Fusarium* mycotoxins in Argentina. *Zentralbl. Veterinarmed. A*, 35(8): 610-6.

Mbandi, E. and Pestka, J.J. **2006**. Deoxynivalenol and satratoxin G potentiate proinflammatory cytokine and macrophage inhibitory protein 2 induction by *Listeria* and *Salmonella* in the macrophage. *J. Food. Prot.*, 69(6): 1334-9.

McDonald, P.P., Bald, A. and Cassatella, M.A. **1997**. Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood*, 89(9): 3421-33.

McDonald, P.P., Gasperini, S., Calzetti, F. and Cassatella, M.A. **1998**. Modulation by interferon-gamma of the production and gene expression of IL-1 receptor antagonist in human neutrophils. *Cell Immunol.*, 184(1): 45-50.

Meky, F.A., Turner, P.C., Ashcroft, A.E., Miller, J.D., Qiao, Y.L., Roth, M.J. and Wild, C.P. **2003**. Development of a urinary biomarker of human exposure to deoxynivalenol. *Food. Chem. Toxicol.*, 41(2): 265-73.

Mikkelsen, L.L., Naughton, P.J., Hedemann, M.S. and Jensen, B.B. **2004**. Effects of physical properties of feed on microbial ecology and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the pig gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(6): 3485-92.

Mizgerd, J.P. **2002**. Molecular mechanisms of neutrophil recruitment elicited by bacteria in the lungs. *Semin. Immunol.*, 14(2): 123-32.

Moon, Y. and Pestka, J.J. **2002**. Vomitoxin-induced cyclooxygenase-2 gene expression in macrophages mediated by activation of ERK and p38 but not JNK mitogen-activated protein kinases. *Toxicol. Sci.*, 69(2): 373-82.

Moore, C.J., Blaney, B.J., Spencer, R.A. and Dodman, R.L. **1985**. Rejection by pigs of mouldy grain containing deoxynivalenol. *Aust. Vet. J.*, 62(2): 60-2.

Morooka, N., Uratsuji, N., Yoshizawa, T. and Yamamoto, H. **1972**. Studies on the toxic substances in barley infected with *Fusarium* spp. *Jpn J. Food Hyg.*, 13: 368-375.

Morrissey, R.E. and Vesonder, R.F. **1985**. Effect of deoxynivalenol (vomitoxin) on fertility, pregnancy, and postnatal development of Sprague-Dawley rats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49(5): 1062-6.

## N

Niderkorn, V., Boudra, H., Morgavi, D.P. **2006**. Binding of Fusarium mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. *J. Appl. Microbiol.*, 101: 849-856.

## O

Oswald, I.P. and Comera, C. **1998**. Immunotoxicity of mycotoxins. *Rev. Med. Vet.*, 149: 585-590.

Oswald, I.P., Desautels, C., Laffitte, J., Fournout, S., Peres, S.Y., Odin, M., Le Bars, P., Le Bars, J. and Fairbrother, J.M. **2003**. Mycotoxin fumonisin B1 increases intestinal colonization by pathogenic *Escherichia coli* in pigs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(10): 5870-4.

Ott, S.J., Musfeldt, M., Wenderoth, D.F., Hampe, J., Brant, O., Folsch, U.R., Timmis, K.N. and Schreiber, S. **2004**. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*, 53(5): 685-93.

Ouyang, Y.L., Azcona-Olivera, J.I., Murtha, J. and Pestka, J.J. **1996**. Vomitoxin-mediated IL-2, IL-4, and IL-5 superinduction in murine CD4+ T cells stimulated with phorbol ester calcium ionophore: relation to kinetics of proliferation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 138(2): 324-34.

## P

Pestka, J.J. **2003**. Deoxynivalenol-induced IgA production and IgA nephropathy-aberrant mucosal immune response with systemic repercussions. *Toxicol. Lett.*, 140-141: 287-95.

Pestka, J.J. **2008**. Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis. *Food Addit. Contam.*: 1-13.

Pestka, J.J. and Smolinski, A.T. **2005**. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*, 8(1): 39-69.

Pestka, J.J., Yan, D. and King, L.E. **1994**. Flow cytometric analysis of the effects of *in vitro* exposure to vomitoxin (deoxynivalenol) on apoptosis in murine T, B and IgA+ cells. *Food Chem. Toxicol.*, 32(12): 1125-36.

Pestka, J.J., Zhou, H.R., Moon, Y. and Chung, Y.J. **2004**. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicol. Lett.*, 153(1): 61-73.

Pinton, P., Accensi, F., Beauchamp, E., Cossalter, A.M., Callu, P., Grosjean, F. and Oswald, I.P. **2008**. Ingestion of deoxynivalenol (DON) contaminated feed alters the pig vaccinal immune responses. *Toxicol. Lett.*, 177(3): 215-22.



- Pinton, P., Bracarense, A.P., Taranu, I., Marin, D., Ferrier, L. and Oswald, I. **2007**. *The barrier function of human and pig intestine is altered by deoxynivalenol*. 12th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Istanbul, Turkey.
- Pinton, P., Royer, E., Accensi, F., Marin, D., Guelfi, J.F., Bourges-Abella, N., Granier, R., Grosjean, F. and Oswald, I. **2004**. Effets zootechniques et immunitaires de la consommation d'aliment naturellement contaminé par du déoxynivalenol (DON) chez le porc en phase de croissance ou de finition. *Journées Rech. Porcine*, 36: 301-308.
- Pluske, J.R., Montagne, L., Cavaney, F.S., Mullan, B.P., Pethick, D.W. and Hampson, D.J. **2007**. Feeding different types of cooked white rice to piglets after weaning influences starch digestion, digesta and fermentation characteristics and the faecal shedding of beta-haemolytic *Escherichia coli*. *Br. J. Nutr.*, 97(2): 298-306.
- Prelusky, D.B., Hartin, K.E., Trenholm, H.L. and Miller, J.D. **1988**. Pharmacokinetic fate of <sup>14</sup>C-labeled deoxynivalenol in swine. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 10(2): 276-86.

## R

- Reed, W.M., Olander, H.J. and Thacker, H.L. **1986**. Studies on the pathogenesis of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella choleraesuis* var *kunzendorf* infection in weanling pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 47(1): 75-83.
- Rodriguez, A., Pangloli, P., Richards, H.A., Mount, J.R. and Draughon, F.A. **2006**. Prevalence of *Salmonella* in diverse environmental farm samples. *J. Food Prot.*, 69(11): 2576-80.
- Rotter, B.A., Prelusky, D.B. and Pestka, J.J. **1996**. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health*, 48(1): 1-34.
- Rotter, B.A., Thompson, B.K., Lessard, M., Trenholm, H.L. and Tryphonas, H. **1994**. Influence of low-level exposure to *Fusarium* mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 23(1): 117-24.

## S

- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T. and Hume, D.A. **2004**. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.*, 75(2): 163-89.
- SCOOP **2003**. Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake of the population of EU member states. Directorate-general health and consumer protection. Available : <http://europa.eu.int:comm/food:fs:scoop:task3210.pdf> (Accessed Nov 20, 2008).
- Severino, L., Luongo, D., Bergamo, P., Lucisano, A. and Rossi, M. **2006**. Mycotoxins nivalenol and deoxynivalenol differentially modulate cytokine mRNA expression in Jurkat T cells. *Cytokine*, 36(1-2): 75-82.

- Simpson, J.M., McCracken, V.J., Gaskins, H.R. and Mackie, R.I. **2000**. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(11): 4705-14.
- Steinbach, G., Methner, U., Springer, S., Lindner, T. and Selbitz, H.J. **2003**. [The humeral immune response of swine after experimental infection with *Salmonella typhimurium*]. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 116(3-4): 124-9.
- Stoev, S.D., Goundasheva, D., Mirtcheva, T. and Mantle, P.G. **2000**. Susceptibility to secondary bacterial infections in growing pigs as an early response in ochratoxicosis. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 52(4): 287-96.
- Strieter, R.M., Kasahara, K., Allen, R.M., Standiford, T.J., Rolfe, M.W., Becker, F.S., Chensue, S.W. and Kunkel, S.L. **1992**. Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8. *Am. J. Pathol.*, 141(2): 397-407.
- Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo, Y., Kasuga, F. and Kumagai, S. **1998**. Effect of trichothecenes on host defense against infectious diseases. *Mycotoxins*, 47: 19-23.
- Sugita-Konishi, Y. and Pestka, J.J. **2001**. Differential upregulation of TNF-alpha, IL-6, and IL-8 production by deoxynivalenol (vomitoxin) and other 8-ketotrichothecenes in a human macrophage model. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 64(8): 619-36.
- Sundstol Eriksen, G., Pettersson, H. and Lundh, T. **2004**. Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. *Food. Chem. Toxicol.*, 42(4): 619-24.
- Swamy, H.V., Smith, T.K., Cotter, P.F., Boermans, H.J. and Sefton, A.E. **2002**. Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on production and metabolism in broilers. *Poult. Sci.*, 81(7): 966-75.
- Swanson, S.P., Helaszek, C., Buck, W.B., Rood, H.D., Jr. and Haschek, W.M. **1988**. The role of intestinal microflora in the metabolism of trichothecene mycotoxins. *Food. Chem. Toxicol.*, 26(10): 823-9.

## T

- Tai, J.H. and Pestka, J.J. **1988**. Impaired murine resistance to *Salmonella typhimurium* following oral exposure to the trichothecene T-2 toxin. *Food Chem. Toxicol.*, 26(8): 691-8.
- Takayama, H., Shimada, N., Mikami, O. and Murata, H. **2005**. Suppressive effect of deoxynivalenol, a *Fusarium* mycotoxin, on bovine and porcine neutrophil chemiluminescence: an in vitro study. *J. Vet. Med. Sci.*, 67(5): 531-3.
- Tanguy, M., Burel, C., Pinton, P., Guerre, P., Grosjean, F., Queguiner, M., Cariolet, R., Tardieu, D., Rault, J.C., Oswald, I.P. and Fravallo, P. **2006**. Effets des fumonisines sur la santé du porc: sensibilité aux salmonelles et statut immunitaire. *Journées Rech. Porcine*, 38: 393-398.

- Tannock, G.W., Munro, K., Harmsen, H.J., Welling, G.W., Smart, J. and Gopal, P.K. **2000**. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(6): 2578-88.
- Tenk, I., Fodor, E. and Szathmary, C. **1982**. The effect of pure Fusarium toxins (T-2, F-2, DAS) on the microflora of the gut and on plasma glucocorticoid levels in rat and swine. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [A]*, 252(3): 384-93.
- Tiemann, U., Brussow, K.P., Jonas, L., Pohland, R., Schneider, F. and Danicke, S. **2006**. Effects of diets with cereal grains contaminated by graded levels of two Fusarium toxins on selected immunological and histological measurements in the spleen of gilts. *J. Anim. Sci.*, 84(1): 236-45.
- Tutelyan, V.A. **2004**. Deoxynivalenol in cereals in Russia. *Toxicol. Lett.*, 153(1): 173-9.

## U

- Ueno, Y. and Fukushima, K. **1968**. Inhibition of protein and DNA syntheses in Ehrlich ascites tumour by nivalenol, a toxic principle of *Fusarium nivale*-growing rice. *Experientia*, 24(10): 1032-3.
- Uzzau, S., Brown, D.J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadesus, J., Platt, D.J. and Olsen, J.E. **2000**. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol. Infect.*, 125(2): 229-55.

## V

- Vesonder, R.F., Ciegler, A. and Jensen, A.H. **1973**. Isolation of the emetic principle from *Fusarium*-infected corn. *Appl. Microbiol.*, 26(6): 1008-10.
- Vidal, D. and Mavet, S. **1989**. In vitro and in vivo toxicity of T-2 toxin, a *Fusarium* mycotoxin, to mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.*, 57(7): 2260-4.
- Vidal, D.R. **1990**. Propriétés immunosuppressives des mycotoxines du groupe des trichothécènes. *Bull. Inst. Pasteur*, 88: 159-192.

## W

- Wache, Y., Valat, C., Postollec, G., Bougeard, S., Burel, C., Oswald, I.P. and Fravallo, P. **2009**. Impact of deoxynivalenol on the intestinal microflora of pigs. *Int. J. Mol. Sci.*, 10: 1-17.
- Wang, Y., Qu, L., Uthe, J.J., Bearson, S.M., Kuhar, D., Lunney, J.K., Couture, O.P., Nettleton, D., Dekkers, J.C. and Tuggle, C.K. **2007**. Global transcriptional response of porcine mesenteric lymph nodes to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Genomics*, 90(1): 72-84.
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P. and Halbwachs-Mecarelli, L. **2000**. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.*, 80(5): 617-53.

Wong, S.S., Zhou, H.R., Marin-Martinez, M.L., Brooks, K. and Pestka, J.J. **1998**. Modulation of IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha secretion and mRNA expression by the trichothecene vomitoxin in the RAW 264.7 murine macrophage cell line. *Food Chem. Toxicol.*, 36(5): 409-19.

Wong, S.S., Zhou, H.R. and Pestka, J.J. **2002**. Effects of vomitoxin (deoxynivalenol) on the binding of transcription factors AP-1, NF-kappaB, and NF-IL6 in raw 264.7 macrophage cells. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 65(16): 1161-80.

Worrell, N.R., Mallett, A.K., Cook, W.M., Baldwin, N.C. and Shepherd, M.J. **1989**. The role of gut micro-organisms in the metabolism of deoxynivalenol administered to rats. *Xenobiotica*, 19(1): 25-32.

## Y

Yang, G.H., Jarvis, B.B., Chung, Y.J. and Pestka, J.J. **2000**. Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p38 MAPK, and SAPK/JNK activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 164(2): 149-60.

Young, J.C., Zhou, T., Yu, H., Zhu, H., Gong, J. **2007**. Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. *Food. Chem. Toxicol.*, 45: 136-143.

## Z

Zhou, H.R., Harkema, J.R., Hotchkiss, J.A., Yan, D., Roth, R.A. and Pestka, J.J. **2000**. Lipopolysaccharide and the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol) synergistically induce apoptosis in murine lymphoid organs. *Toxicol. Sci.*, 53(2): 253-63.

Zhou, H.R., Lau, A.S. and Pestka, J.J. **2003**. Role of double-stranded RNA-activated protein kinase R (PKR) in deoxynivalenol-induced ribotoxic stress response. *Toxicol. Sci.*, 74(2): 335-44.

Zinedine, A., Soriano, J.M., Molto, J.C. and Manes, J. **2007**. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food. Chem. Toxicol.*, 45(1): 1-18.

Ziprin, R.L., Holt, P.S. and Mortensen, R.F. **1987**. T-2 toxin effects on the serum amyloid P-component (SAP) response of *Listeria monocytogenes*- and *Salmonella typhimurium*-infected mice. *Toxicol. Lett.*, 39(2-3): 177-84.

# ANNEXES

**The food contaminant fumonisin B<sub>1</sub> reduces the maturation of porcine CD11R1<sup>+</sup> intestinal antigen presenting cells and antigen-specific immune responses, leading to a prolonged intestinal ETEC infection**

Bert DEVRIENDT<sup>1,†,\*</sup>, Mélanie GALLOIS<sup>2,†</sup>, Frank VERDONCK<sup>1</sup>, Yann WACHE<sup>2</sup>, Diane BIMCZOK<sup>3,4</sup>, Isabelle P. OSWALD<sup>2</sup>, Bruno M. GODDEERIS<sup>1,5</sup>, Eric COX<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium

<sup>2</sup> Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, UR 66, Institut National de la Recherche Agronomique, Toulouse, France

<sup>3</sup> Institute of Anatomy, Otto-von-Guericke University, Leipziger Strasse 44, 39120 Magdeburg, Germany

<sup>4</sup> present affiliation: Department of Medicine, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA

<sup>5</sup> Vaccine design, Department of Biosystems, K.U.Leuven, Kasteelpark Arenberg 30, B-3001 Heverlee, Belgium

(Received 10 December 2008; accepted 23 April 2009)

<sup>†</sup>Equally contributed

- Corresponding author: [b.devriendt@ugent.be](mailto:b.devriendt@ugent.be)

Short Title: FB<sub>1</sub> intake influences mucosal immune system

**Abstract** – Consumption of food or feed contaminated with fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), a mycotoxin produced by *Fusarium verticillioides*, can lead to disease in humans and animals. The present study was conducted to examine the effect of FB<sub>1</sub> intake on the intestinal immune system. Piglets were used as a target and as a model species for humans since their gastro-intestinal tract is very similar. The animals were orally exposed to a low dose of FB<sub>1</sub> (1 mg/kg body weight FB<sub>1</sub>) for 10 days which did not result in clinical signs. However, when compared to non-exposed animals, FB<sub>1</sub>-exposed animals showed a longer shedding of F4<sup>+</sup> enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) following infection and a lower induction of the antigen-specific immune response following oral immunization. Further analyses to elucidate the mechanisms behind these observations revealed a reduced intestinal expression of IL-12p40, an impaired function of intestinal antigen presenting cells (APC), with decreased upregulation of Major Histocompatibility Complex Class II molecule (MHC-II) and reduced T cell stimulatory capacity upon stimulation. Taken together, these results indicate an FB<sub>1</sub>-mediated reduction of in vivo APC maturation.

**Fumonisin B<sub>1</sub> / intestinal APC / F4(K88)+ enterotoxigenic *Escherichia coli* / mucosal immunization**

## 1. Introduction

Mycotoxins are secondary fungal metabolites that can be produced in crops and other food commodities both pre- and post-harvest. The consumption of contaminated food/feed can be responsible for diseases in humans and animals [26, 30]. The fumonisins, which are produced by *Fusarium verticillioides* and related fungi, are among the most widespread mycotoxins [23]. Different types of fumonisins have been structurally identified. The 'B' series include the most prevalent type, the fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), which is estimated to contaminate 59% of the corn and corn-based products worldwide [14]. Consumption of FB<sub>1</sub>-contaminated moldy sorghum and maize can result in several human gastrointestinal disorders [3]. An increased prevalence of neural tube defects among Mexican-American women is also attributed to FB<sub>1</sub> contamination of the crop harvest. Furthermore, fumonisins can cause liver and kidney toxicity and carcinogenicity, pulmonary edema and immunosuppression [24]. Their mode of action is not completely understood but they are known to influence the sphingolipid metabolism through the inhibition of ceramide synthase [11]. Sphingolipids are a class of membrane lipids which play an important role in several cellular mechanisms such as signal transduction pathways, cell contact, growth, differentiation and death, and immunity.

As fumonisins enter the body following consumption of contaminated food/feed, the intestine will be the first organ exposed to these toxins and negative effects of these toxins on the gastrointestinal tract have been reported [9]. In pig, FB<sub>1</sub> increases the intestinal colonization by pathogenic *Escherichia coli* [27]. This could be attributed to the negative impact of FB<sub>1</sub> on the intestinal barrier. Indeed, FB<sub>1</sub> alters the intestinal barrier function by influencing the sphingolipid metabolism, as demonstrated by an increase in the amount of free sphingoid bases, a depletion of glycolipids in the plasma membrane and an increase in trans-epithelial flux [6, 18]. However, an effect of FB<sub>1</sub> on the mucosal immune system could also be involved in the altered interaction between FB<sub>1</sub>-exposed animals and intestinal pathogens. Several studies demonstrated that FB<sub>1</sub> affects the innate immunity, as well as humoral and cellular responses from the acquired immunity [2, 7, 21, 24, 38]. It is shown that FB<sub>1</sub> decreases IL-8 expression both in intestinal tissue and in an intestinal epithelial cell line [8]. Further information concerning the mode of action of FB<sub>1</sub> on the intestinal immune system is however needed.

F4<sup>+</sup> enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) adhere with their F4 fimbriae to F4-specific receptors (F4R) on the intestinal epithelium of piglets, then colonize the small intestine and induce diarrhea. Following infection, an F4-specific immune response is induced within a week which terminates the F4<sup>+</sup> ETEC excretion [44]. F4 fimbriae induce a strong mucosal immunity in piglets. Mucosal immunization of weaned piglets with purified F4 fimbriae induces a potent F4-specific intestinal immune response protecting these animals against a subsequent oral challenge with F4<sup>+</sup> ETEC [41]. The F4-mediated adhesion to specific F4R is required for this protective F4-specific immune response as an oral immunization of F4R-negative animals fails to induce such an immune response [42]. In the present study, the F4 model is used to analyze the influence of FB<sub>1</sub> feeding on the porcine intestinal immune system.



## 2. Materials and Methods

### 2.1. Experimental design

#### 2.1.1. Animals and housing

Twenty five conventionally bred pigs (Belgian Landrace x Pietrain) weaned between 3 and 4 weeks of age were housed in isolation units. They were fed ad libitum with a commercial starter diet and treated orally with colistine, an antibiotic against Gr<sup>-</sup> bacteria, for three consecutive days following weaning (Promycine pulvis, VMD, Berendonk, Belgium, 150 000 U/kg body weight/day) to prevent *E. coli* infections which could arise due to handling and transport of the animals. The piglets were screened to be F4-seronegative using the F4-specific ELISA [41] as well as F4R<sup>+</sup> using the PCR method described by Rasschaert et al. [33]. The presence of the F4R was confirmed post-mortem using the in vitro villous adhesion assay. Adhesion of > 5 bacteria per 250 µm villous length was considered as positive [10]. Males and females were equally divided in the groups. All animal procedures were approved by a local ethical committee.

#### 2.1.2. FB<sub>1</sub> feeding and allotment

Piglets were randomly divided into a group that received a FB<sub>1</sub>-containing fungal extract (n = 11) and a group that received PBS (n = 14) (Tab. I). FB<sub>1</sub> was extracted from an in vitro culture of the *Fusarium verticilloides* strain NRRL 34281 as previously described [27]. This crude extract contained 54% FB<sub>1</sub>, 8% FB<sub>2</sub> and 9% FB<sub>3</sub> and no detectable amounts of zearalenone, fusarochromanone, deoxynivalenol or other trichothecenes. One week after weaning, FB<sub>1</sub> (or PBS) was orally provided at a dose of 1 mg/kg of body weight/day in 10 mL PBS for 10 days (day -10 until day 0). All animals were weighed at the beginning and at the end of the administration period. On day 0, animals were either challenged with an F4<sup>+</sup> ETEC strain (n = 10), orally immunized with purified F4 fimbriae (n = 9) or euthanized to analyze the effects of FB<sub>1</sub> on the mucosal immune system (n = 6).

### 2.2. Experimental infection and immunization

#### 2.2.1. F4<sup>+</sup> ETEC infection

Five piglets of both the FB<sub>1</sub> and PBS group were orally infected with the F4<sup>+</sup> ETEC strain GIS26 (Tab. I). Piglets were sedated with Stresnil (40 mg/mL; Janssen-Cilag, Berchem, Belgium), after which the gastric pH was neutralized by intragastric administration of 62 mL NaHCO<sub>3</sub> (1.4% (w/v) in distilled water). Next, 10<sup>10</sup> F4<sup>+</sup> ETEC in 10 mL PBS were intragastrically administered. From day 0 till day 9, the fecal F4<sup>+</sup> *E. coli* excretion was daily quantified by dot blotting, using the F4-specific monoclonal antibody (mAb) IMM01 as previously described [41]. The prevalence and the severity of diarrhea were scored blindly according to the visual aspect of the feces. All piglets were weighed every 3 days from the start of the FB<sub>1</sub> administration till the end of the F4<sup>+</sup> *E. coli* excretion.

#### 2.2.2. Oral F4 *E. coli* immunization

Three animals of both the FB<sub>1</sub> and the PBS group were orally immunized with 2 mg purified F4 fimbriae in 10 mL PBS (FB<sub>1</sub>+F4 and F4 group respectively) on three subsequent days (day 0-2) (Tab. I). Three non-exposed animals receiving

only PBS served as negative controls (PBS group). F4 fimbriae were purified from strain IMM01 as previously described [41]. From 3 h before till 2 h after immunization, piglets were deprived of food and water. One week later (day 7-8), the animals were euthanized by intracardial injection of pentobarbital (24 mg/kg; Nembutal, Sanofi Santé Animale, Brussels, Belgium) followed by exsanguination. Subsequently, monomorphonuclear cells (MC) were isolated from the jejunal lamina propria (LP) as described in section 2.4.1. and from the mesenteric lymph node (MLN) and jejunal and ileal Peyer's patches (JPP and IPP) as previously described [44]. For each MC suspension, the number of F4-specific IgM, IgA and IgG antibody secreting cells (ASC) were determined as described by Van den Broeck et al. [42]. Spots in 5 wells ( $10^6$  MC/well) were counted with an ELISpot reader (Immunospot, CTL) to obtain the number of isotype-specific ASC per  $5 \times 10^6$  MC.

### **2.3. FB<sub>1</sub> and the mucosal immune system**

Three animals from both the FB<sub>1</sub> and the PBS group were euthanized at day 0 to analyze the influence of FB<sub>1</sub> exposure on the intestinal immune system (Tab. I). MC were isolated from MLN, LP, IPP and JPP (section 2.2.2)

#### **2.3.1. Intestinal immune cell subpopulations**

To analyze whether FB<sub>1</sub> feeding influenced the number of immune cells in the intestinal mucosa (T cell populations: CD2<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>; myeloid cells: CD172<sup>+</sup>; B cells: IgM<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>; APC and endothelial cells: IgM<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>),  $2.5 \times 10^5$  cells were incubated with optimal concentrations of mAbs (Tab. II), washed and incubated with the appropriate isotype-specific FITC- or PE-conjugated antibodies (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA). After a final wash step with ice-cold PBS, 5 nM Sytox Red (Invitrogen, Merelbeke, Belgium) was added to allow gating of living cells. Data were acquired on a FACSCanto flow cytometer (Beckton Dickinson, Erebodegem, Belgium) with a minimum event count of 30 000 and analyzed with FACSDiva® software.

#### **2.3.2. MC proliferative activity**

The MC were also functionally characterized by analyzing their proliferative activity. The cells were cultured at  $5 \times 10^5$  cells/well in a 96-well culture plate in leukocyte medium (RPMI-1640, 5% FCS, 1 mM sodium pyruvate (Gibco, Merelbeke, Belgium), 2 mM L-glutamine (Gibco), 100 µg/mL kanamycin (Gibco), 50 µg/mL gentamycin (Gibco), 50 µM 2-mercaptoethanol) and subsequently treated with F4 (20 µg), flagellin (20 µg) or 5 µg of one of the mitogens concanavalin A (ConA) (Sigma, Bornem, Belgium), pokeweed mitogen (PWM) (Sigma) or phytohemagglutinin (PHA) (Sigma) or left untreated. Flagellin was isolated from the strain GIS26 FaeG using the same protocol as to purify F4 fimbriae [46]. Cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere at 5% CO<sub>2</sub>. After 72 h the cells were pulse-labeled with 1 µCi [<sup>3</sup>H]-thymidine (Amersham ICN, Bucks, UK) per well and 18 h later harvested onto glass fiber filters (Perkin-Elmer, Life Science, Brussels, Belgium). The incorporated radioactivity was measured using a  $\beta$ -scintillation counter (Perkin-Elmer).

### 2.3.3. Cytokine expression by MC

To analyze the influence of FB<sub>1</sub> feeding on cytokine expression by intestinal MC, 10<sup>7</sup> cells per sample were stored at -80 °C in TRIzol Reagent (Invitrogen) until cDNA synthesis. The amount of mRNA transcripts from genes encoding cytokines was measured in triplicates by real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR). Briefly, 8 ng cDNA was mixed with the Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and porcine-specific primers for housekeeping genes (cyclophilin A, 2-microglobulin, -actin) and genes encoding cytokines (IL-1 , IL-6, IL-12p40, IL-18, TNF- ) (Tab. III). The reactions were denatured at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min in the ABI Prism 7000 Sequence Detection System. Data were analyzed using the method of Peirson et al. [28] and individual values for cytokine expression were obtained after normalization to the 3 housekeeping genes (relative quantification).

## 2.4. Activity of the small intestinal lamina propria CD11R1<sup>+</sup> cell population

### 2.4.1. Enrichment of CD11R1<sup>+</sup> cells from jejunal lamina propria MC

MC were isolated from the lamina propria by collagenase digestion as previously described [46]. The peritoneum and muscle layers were stripped off, after which the intestine was opened along the mesenteric side. Subsequently, the remaining tissue was cut into pieces (1 cm<sup>2</sup>) and incubated in a shaking incubator for 3 x 40 min at 37 °C, 150 rpm, in HBSS-EDTA solution (Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-free HBSS pH 7.2, 0.94 mM DTT (Sigma), 2.52 mM kestranal (EDTA), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin) to remove the epithelium. Next, the tissue was incubated in a shaking incubator for 30 min at 37 °C, 150 rpm in complete medium (RPMI 1640, 5% FCS, 20 mM HEPES (Gibco), 0.1 mg/ml DNaseI (Roche), penicillin/streptomycin (P/S)) and subsequently into a collagenase solution (complete medium, 0.18 U/mL Collagenase A (Sigma)) for 1 h at 37 °C, 120 rpm. The cell suspension was then filtered through a wire mesh, followed by a 70 µm cell strainer (Beckton Dickinson), pelleted (400 g, 10 min, 4 °C) and resuspended in complete medium for 10 min at 37 °C. Subsequently, the low density LP MC were enriched by lymphoprep density gradient centrifugation (Axis-Shield, Oslo, Norway) at 800 g and 18 °C for 30 min.

APC were further enriched from the MC fraction by immunomagnetic separation with the anti-CD11R1 mAb (Tab. II) and the EasySep<sup>®</sup> FITC selection kit (StemCell Technologies, Grenoble, France) according to the manufacturer's instructions. CD11R1 is recognized by the anti-human CD11b mAb TMG6-5, which binds the same epitope on human CD11b and porcine CD11R1. However, the cellular expression pattern of both molecules differs greatly, implying a different function of CD11R1 in pigs [13]. Nonetheless, CD11R1 has previously been used to characterize porcine APC [4, 50]. The isolated cells were labelled with anti-CD11R1 and FITC-conjugated anti-mouse IgG<sub>1</sub> (BD). Subsequently, these cells were linked to magnetic nanoparticles using the FITC selection cocktail. To remove unlabelled cells, the cell suspension was placed in a EasySep<sup>®</sup> magnet for 5 min, after which the supernatans was poured off. The

retained cells were resuspended in PBS/1mM EDTA and the procedure was repeated to achieve a 90-95% purity of CD11R1<sup>+</sup> lamina propria cells.

#### 2.4.2. Phenotypic analysis and Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)

The enriched CD11R1<sup>+</sup> LP cells were cultured in a 24-well plate at  $5 \times 10^5$  cells/well in DMEM (Gibco), supplemented with 10% FCS, P/S and 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gentamycin. The cells were stimulated overnight with 50  $\mu\text{g}$  purified endotoxin-free (AffinityPak Detoxi-gel; Pierce) F4 or flagellin at 37 °C in a humidified atmosphere at 5% CO<sub>2</sub>. Following stimulation, cells were analyzed for surface expression of MHC-II and CD80/86 by flow cytometry as described above. Gates were set on the CD11R1<sup>+</sup> LP APC population.

Stimulated CD11R1<sup>+</sup> LP cells were also used as stimulator cells in a MLR to analyze their allogeneic T cell stimulatory capacity as previously described [5]. Briefly, PBMC were purified from heparinized blood samples from an unrelated pig by lymphoprep density gradient centrifugation. Lymphocytes were further enriched from the PBMC cell fraction by depletion of CD172<sup>+</sup> monocytic cells (Tab. II) using magnetic cell sorting (MACS system; Miltenyi Biotec GmbH). CD11R1<sup>+</sup> LP cells were added to  $2 \times 10^5$  lymphocytes at different ratios per well of a 96-well plate. After 3 days of allogeneic responses, cocultures were pulsed, harvested and the proliferation was measured as described above.

### 2.5. Statistics

Statistical analyses were performed using SPSS 16. Normal distribution of all the data was analyzed using the Kolmogorov-Smirnov test and tested for variance homogeneity with the Levine test. The number of F4<sup>+</sup> *E. coli* excreted per day, average daily weight gain, the FCM data and cytokine results were compared with one-way ANOVA and Bonferroni adjustment. The ELISpot and the MLR data were first logarithmically transformed to homogenize variances and then analyzed with a one-way ANOVA and LSD adjustment to test the effect of FB<sub>1</sub> exposure. A two-way ANOVA (FB<sub>1</sub> exposure, day of the experiment) was used to analyze the effect of the FB<sub>1</sub> treatment on the whole F4<sup>+</sup> *E. coli* excretion period. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Oral FB<sub>1</sub> intake prolongs intestinal infection

F4-seronegative and F4R<sup>+</sup> piglets were infected with F4<sup>+</sup> ETEC to analyze the influence of FB<sub>1</sub> exposure on an intestinal infection. The overall shedding of F4<sup>+</sup> *E. coli* was higher in the FB<sub>1</sub> group ( $p = 0.040$ ) and the excretion lasted 2 more days than in the PBS group (9 vs. 7 days) (Fig. 1A). To examine if this longer shedding could be attributed to a different F4R expression level, a villus adhesion test was performed. There was no difference between FB<sub>1</sub>-exposed and control animals in adherence of F4<sup>+</sup> ETEC to the villi (30 to 89 bacteria per 250  $\mu\text{m}$  villous length for all piglets). The mean consistency index of the feces was similar for both groups and the average daily weight gain was not affected by FB<sub>1</sub> before (FB<sub>1</sub> group  $0.189 \pm 0.052$  kg/day; PBS group  $0.205 \pm 0.028$  kg/day) or after the F4<sup>+</sup> *E. coli* infection (FB<sub>1</sub> group  $0.275 \pm 0.063$  kg/day; PBS group  $0.297 \pm 0.053$

kg/day). These results show that consumption of FB<sub>1</sub>-contaminated feed could lead to a prolonged intestinal infection.

### 3.2. Oral FB<sub>1</sub> intake reduces the mucosal immune response

The effects of FB<sub>1</sub> exposure on the immune response of piglets to an F4 mucosal immunization were analyzed by enumerating the F4-specific ASC (Fig. 1B-D). One week after the immunization, significant higher numbers of F4-specific ASC were found in the F4 group compared to the PBS group (IgM: MLN ( $p = 0.001$ ), JPP (0.001) and the IPP (0.014); IgA: MLN (0.005), JPP (0.044), IPP (0.001) and the LP, (0.013); IgG: MLN (0.040) and IPP (0.023)). Furthermore, immunization of FB<sub>1</sub>-exposed animals resulted in significant more F4-specific ASC compared to the PBS group (IgM: MLN ( $p = 0.002$ ), JPP (0.021) and LP (0.043); IgA: MLN (0.026), JPP (0.03) and IPP (0.001); IgG: LP (0.043)). These results indicate that both in the F4 and the F4+FB<sub>1</sub> group an F4-specific immune response was mounted. When the F4+FB<sub>1</sub> group was compared to the F4 group, lower numbers of F4-specific IgM and IgA ASC were observed in most tissues. This difference is only significant for IgM ASC in the JPP ( $p = 0.003$ ). Nonetheless, the overall mucosal immune response (total number of IgA ASC, independent from intestinal location) was significant lower in the F4+FB<sub>1</sub> group compared to the F4 group ( $p = 0.02$ ), which seems to indicate that FB<sub>1</sub>-contaminated feed could have a negative influence on the induction of antigen-specific immune responses following mucosal vaccination.

### 3.3. Modulation of the mucosal immune system by oral FB<sub>1</sub> exposure

To analyze the influence of FB<sub>1</sub> exposure on the mucosal immune system, MC were isolated from MLN, LP, IPP and JPP of FB<sub>1</sub>-exposed (FB<sub>1</sub> group) and non-exposed (PBS group) animals. The number of B cells, myeloid cells and specific T cell populations were identical in both groups (data not shown). Moreover, the number of MHC-II<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> LP MC was not influenced by FB<sub>1</sub> treatment (FB<sub>1</sub>:  $18.9\% \pm 8.5$ ; PBS:  $16.3\% \pm 6.3$ ). Similarly, their proliferation following incubation with different mitogens, F4 fimbriae or flagellin, was not influenced by FB<sub>1</sub> (data not shown). However, the analysis of cytokine mRNA by qRT-PCR revealed a significant reduction of IL-12p40 expression in the IPP of FB<sub>1</sub>-exposed animals ( $p = 0.027$ ) (Fig. 2). Furthermore, in the LP both IL-6 and IL-12p40 mRNA expression were reduced. The IL-12 cytokine is mainly produced by APC. Therefore, further experiments were performed to analyze whether FB<sub>1</sub> exposure could influence intestinal LP APC. Immunomagnetic enrichment of LP cells routinely yielded a 90-95% pure population of CD11R1<sup>+</sup> cells, consisting of MHC-II<sup>+</sup> APC with contaminating MHC-II<sup>-</sup> eosinophils (Fig. 3a and b). The CD11R1<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup> LP APC appear to have a typical dendritic cell morphology (Fig. 3d). Interestingly, in vivo FB<sub>1</sub> exposure had no influence on the relative CD11R1<sup>+</sup> eosinophil or APC percentages in FCM analyses (data not shown). In vitro stimulation of CD11R1<sup>+</sup> LP cells with F4 and the TLR5 ligand flagellin resulted in a significantly increased expression of the APC maturation markers MHC-II (F4:  $p = 0.003$  and Flag: 0.001) and CD80/86 (Flag:  $p = 0.001$ ) in comparison to unstimulated cells, implicating CD11R1<sup>+</sup> LP APC in the mucosal immune response to F4<sup>+</sup> ETEC (Fig. 3c and e). Importantly, previous oral

exposure of piglets to FB<sub>1</sub> impaired the ability of these CD11R1<sup>+</sup> LP APC to mature in response to the mucosal antigens F4 and flagellin. Upregulation of MHC-II in cells from FB<sub>1</sub>-exposed animals was reduced in comparison to APC from the control animals ( $p = 0.02$  and  $0.043$  respectively), whereas the difference in CD80/86 expression was not significantly, it was however numerically lower, in the FB<sub>1</sub> group (Fig. 3e). To address a possible influence of FB<sub>1</sub> on APC function, isolated CD11R1<sup>+</sup> LP cells were analyzed for their T cell stimulatory capacity in an allogeneic MLR. The cells were stimulated overnight with F4 or flagellin and used as stimulators. Stimulated CD11R1<sup>+</sup> cells from control animals induced potent T cell proliferation, whereas previous FB<sub>1</sub> exposure of piglets significantly reduced the T cell stimulatory capacity of these cells, whatever the stimulator or the APC/T cell ratio (Tab. IV). These data seem to indicate that oral FB<sub>1</sub> exposure reduces the maturation of intestinal CD11R1<sup>+</sup> LP APC.

#### 4. Discussion

The present study shows that despite the short administration period and the low dose (1mg/kg BW/day), which did not result in any clinical signs or reduced weight gain, oral FB<sub>1</sub> intake prolongs an intestinal ETEC infection. This appears to agree with previous reports wherein piglets receiving FB<sub>1</sub> orally had an increased intestinal colonization 48 h following infection with pathogenic *E. coli* [27]. We did not analyze ETEC colonization, but FB<sub>1</sub> had probably no influence on the intestinal colonization since the F4R expression level was similar on villi of FB<sub>1</sub>-exposed and non-exposed animals. Furthermore, based on results of previous F4<sup>+</sup> ETEC infection experiments, large differences in in vivo F4R expression are required to see differences in F4<sup>+</sup> ETEC colonization between animals [41, 45]. On the other hand, FB<sub>1</sub> is known to affect the intestinal barrier [6], cytokine production by enterocytes [8] and other components of the innate immune response that are first line defense mechanisms [7]. The latter are involved in the initiation of the adaptive immunity which seems to be delayed since the excretion lasted 2 days longer in the FB<sub>1</sub>-exposed piglets. Therefore, an effect of FB<sub>1</sub> on the acquired immune system could be involved.

It has been shown that FB<sub>1</sub> reduces the efficiency of intramuscular vaccination [37]. Accordingly, the present study shows for the first time that a mycotoxin could reduce the induction of an antigen-specific intestinal immune response. In a model with oral F4 immunisation, significant lower numbers of antigen-specific IgM ASC were detected in the JPP of FB<sub>1</sub>-exposed piglets. Furthermore, both the F4-specific IgM and IgA ASC were reduced after FB<sub>1</sub>-exposure. This result suggests that FB<sub>1</sub> could interfere with the induction phase of the immune response, especially since the overall mucosal IgA immune response was significantly reduced in FB<sub>1</sub>-exposed piglets. The adaptive immune system needs around 3 to 5 days to induce an F4-specific immune response and the first F4-specific ASC that appear in the intestine are mainly F4-specific IgM ASCs that subsequently switch to IgA [42, 44]. There are no indications that FB<sub>1</sub> influences IgA synthesis, in contrast to the mycotoxins deoxynivalenol (DON) and nivalenol which selectively stimulate IgA production in porcine Peyer's patches [31].

Dendritic cells (DC) have a central position in the mucosal immune system by connecting innate and acquired immune responses. In the lamina propria, DCs

take up antigens and migrate to the mesenteric lymph nodes where they interact with T cells. Binding of pathogen-associated molecular patterns to pathogen recognition receptors triggers DC maturation and enables them to induce effector T cell responses. DC maturation is characterized by an increased expression of MHC-II and co-stimulatory molecules like CD40, CD80 and CD86 and the secretion of polarizing cytokines like IL-10 and IL-12 [16]. After in vivo FB<sub>1</sub>-exposure, we observed a reduced transcription of IL-12p40 by MC, although restricted to the intestinal IPP, which suggests an effect of FB<sub>1</sub> on APC since these cells are the main producers of this cytokine [39]. Here we found that CD11R1<sup>+</sup> LP APC from control animals upregulated MHC-II and CD80/86 expression in response to F4 and Flag stimulation. On the contrary, CD11R1<sup>+</sup> LP APC from FB<sub>1</sub>-exposed animals had a reduced upregulation of MHC-II expression. We also observed a tendency of FB<sub>1</sub> to reduce the upregulation of CD80/86 expression. Both findings indicate that intestinal CD11R1<sup>+</sup> APC from FB<sub>1</sub>-exposed piglets are less responsive to F4 and Flag stimulation. This contradicts results obtained with human MoDC, where the expression of CD86 was not modulated by FB<sub>1</sub> treatment [36].

These data suggest that FB<sub>1</sub> could affect the maturation of LP APC. A hallmark of mature DC is their ability to induce T cell proliferation due to increased expression of MHC-II and costimulatory molecules, such as CD80/86 [40]. Although a mixed population of CD11R1<sup>+</sup> APC and eosinophils was used to investigate the T cell stimulatory capacity, the obtained results were consistent with the MHC-II and CD80/86 expression. We show for the first time that F4 and flagellin enhance the T cell stimulatory capacity of porcine intestinal CD11R1<sup>+</sup> APC. Moreover, we demonstrate that in vivo FB<sub>1</sub> exposure of piglets resulted in an impaired T cell stimulatory capacity of intestinal CD11R1<sup>+</sup> LP APC. To our knowledge, this has not been previously demonstrated. On the contrary, Bimczok et al. [5] did not observe a reduced ability of porcine MoDC to induce T cell proliferation after treatment with deoxynivalenol, despite the reduced expression of MHCII, CD40 and CD80/86. This discrepancy could be explained by the type of mycotoxin itself or the cell type used as APC model. The possibility that the observed reduction in functional APC maturation is due to an effect of FB<sub>1</sub> on CD11R1<sup>+</sup> APC or eosinophil migration seems unlikely since we observed no difference between FB<sub>1</sub>-exposed and control animals in the number of isolated CD11R1<sup>+</sup> cells, in the relative percentage of CD11R1<sup>+</sup> APC or eosinophils or in the percentage of MHC-II<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> LP APC. The small intestinal LP MC contains mainly 2 MHC-II<sup>+</sup> cell populations, APC and endothelial cells [15]. Although we cannot discriminate between these populations in this study, the number of endothelial cells should remain constant irrespective of FB<sub>1</sub> exposure. Although APC migration does not seem to be affected by FB<sub>1</sub>, the latter could still influence the function of CD11R1<sup>+</sup> LP APC. However, it has been demonstrated that only the CD11R1<sup>+</sup> LP APC migrate from the LP to the MLN [4], suggesting that these cells are functionally the most relevant APC with respect to the induction of a primary immune response.

Despite the small numbers of animals, we report for the first time an effect of a mycotoxin on intestinal APC maturation. The reduced maturation of FB<sub>1</sub>-exposed intestinal APC could explain the longer F4<sup>+</sup> ETEC excretion and the lower F4-

specific immune response to oral F4 immunization in FB<sub>1</sub>-exposed animals. Other effects of FB<sub>1</sub> on the acquired immune system are reported like influx of immune cells [32, 38] or altered T cell proliferation following mitogen stimulation [17, 21]. In the present study FB<sub>1</sub> exposure did not alter these parameters in the porcine intestine.

The observed negative impact of FB<sub>1</sub> on the immune system could be a threat for the health status of humans and animals. The results of this study could be extrapolated to man since the gastrointestinal tract of both species share a lot of similarities [12]. This stresses the need to further develop methods to reduce the consumption of FB<sub>1</sub>-contaminated food [48], which is common in developing countries where the prevalence of several infectious diseases is high [20, 25]. The negative impact of FB<sub>1</sub> on the mucosal immune system can support the emergence of infectious diseases and suggests that the efficiency of vaccination programs would be increased with a concomitant reduction of FB<sub>1</sub> intake by the local population.

### **Acknowledgements**

We thank G. De Smet, D. Slos and R. Cooman for their technical assistance. B. Devriendt has a PhD grant of the Institute for the Promotion of Innovation through Science and Technology in Flanders (IWT-Vlaanderen). F. Verdonck had a post-doctoral grant from the FWO-Vlaanderen, which also provided financial support (projects 1.5.213.07 and G.0013.05). This study was part of the bilateral project Tournesol funded by the Ministerie van de Vlaamse Gemeenschap (Belgium) and the Ministère des Affaires étrangères (France).



## References

- [1] Bailey M., Stevens K., Bland P.W., Stokes C.R., A monoclonal antibody recognising an epitope associated with pig interleukin-2 receptors, *J. Immunol. Methods* (1992) 153:85-91.
- [2] Bhandari N., Sharma R.P., Fumonisin B(1)-induced alterations in cytokine expression and apoptosis signaling genes in mouse liver and kidney after an acute exposure, *Toxicology* (2002) 172:81-92.
- [3] Bhat R.V., Shetty P.H., Amruth R.P., Sudershan R.V., A foodborne disease outbreak due to the consumption of moldy sorghum and maize containing fumonisin mycotoxins, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* (1997) 35:249-255.
- [4] Bimczok D., Sowa E.N., Faber-Zuschratter H., Pabst R., Rothkötter H.J., Site-specific expression of CD11b and SIRPalpha (CD172a) on dendritic cells: implications for their migration patterns in the gut immune system, *Eur. J. Immunol.* (2005) 35:1418-1427.
- [5] Bimczok D., Doll S., Rau H., Goyarts T., Wundrack N., Naumann M., et al., The Fusarium toxin deoxynivalenol disrupts phenotype and function of monocyte-derived dendritic cells in vivo and in vitro, *Immunobiology* (2007) 212:655-666.
- [6] Bouhet S., Hourcade E., Loiseau N., Fikry A., Martinez S., Roselli M., et al., The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells, *Toxicol. Sci.* (2004) 77:165-171.
- [7] Bouhet S., Oswald I.P., The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell derived innate immune response, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2005) 108:199-209.
- [8] Bouhet S., Le Dorze E., Pérès S.Y., Fairbrother J.M., Oswald I.P., Mycotoxin fumonisin B<sub>1</sub> selectively down-regulates basal IL-8 expression in pig intestine: in vivo and in vitro studies, *Food Chem. Toxicol.* (2006) 44:1768-1773.
- [9] Bouhet S., Oswald I.P., The intestine as a possible target for fumonisin toxicity, *Mol. Nutr. Food. Res.* (2007) 51:925-931.
- [10] Cox E., Houvenaghel A., Comparison of the in vitro adhesion of K88, K99, F41 and P987 positive *Escherichia coli* to intestinal villi of 4- to 5-week-old pigs, *Vet. Microbiol.* (1993) 34:7-18.
- [11] Desai K., Sullards M.C., Allegood J., Wang E., Schmelz E.M., Hartl M., et al., Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta.* (2002) 1585:188-189.
- [12] Domeneghini C., Di Giancamillo A., Arrighi S., Bosi G., Gut-trophic feed additives and their effects upon the gut structure and intestinal metabolism. State of the art in the pig, and perspectives towards humans, *Histol. Histopathol.* (2006) 21:273-283.
- [13] Domínguez J., Alvarez B., Alonso F., Thacker E., Haverson K., McCullough K., et al., Workshop studies on monoclonal antibodies in the myeloid panel with CD11 specificity, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2001) 80:111-119

- [14] Haschek W.M., Gumprecht L.A., Smith G., Tumbleson M.E., Constable P.D., Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives, *Environ. Health Perspect.* (2001) 109:251-257.
- [15] Haverson K., Singha S., Stokes C.R., Bailey M., Professional and non-professional antigen-presenting cells in the porcine small intestine, *Immunology* (2000) 101:492-500.
- [16] Iwasaki A., Mucosal Dendritic Cells, *Annu. Rev. Immunol.* (2007) 25:381-418
- [17] Johnson V.J., Sharma R.P., Gender-dependent immunosuppression following subacute exposure to fumonisin B<sub>1</sub>, *Int. Immunopharmacol.* (2001) 1:2023-2034.
- [18] Loiseau N., Debrauwer L., Sambou T., Bouhet S., Miller J.D., Martin P.G., et al., Fumonisin B<sub>1</sub> exposure and its selective effect on porcine jejunal segment: sphingolipids, glycolipids and trans-epithelial passage disturbance, *Biochem. Pharmacol.* (2007) 74:144-152.
- [19] Lunney J.K., Walker K., Goldman T., Aasted B., Bianchi A., Binns R., et al., Overview of the first international workshop to define swine leukocyte cluster of differentiation (CD) antigens, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (1994) 43:193-206.
- [20] Maenetje P.W., Dutton M.F., The incidence of fungi and mycotoxins in South African barley and barley products, *J. Environ. Sci. Health B* (2007) 42:229-236.
- [21] Marin D.E., Gouze M.E., Taranu I., Oswald I.P., Fumonisin B<sub>1</sub> alters cell cycle progression and interleukin-2 synthesis in swine peripheral blood mononuclear cells, *Mol. Nutr. Food Res.* (2007) 51:1406-1412.
- [22] Meissonnier G.M., Pinton P., Laffitte J., Cossalter A.M., Gong Y.Y., Wild C.P., et al., Immunotoxicity of aflatoxin B<sub>1</sub>: Impairment of cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2008) 231:142-149.
- [23] Miller J.D., Aspects of the ecology of Fusarium toxins in cereals, *Adv. Exp. Med. Biol.* (2002) 504:19-27.
- [24] Missmer S.A., Suarez L., Felkner M., Wang E., Merrill A.H. Jr., Rothman K.J., Hendricks K.A., Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border, *Environ. Health Perspect.* (2006) 114:237-241.
- [25] Nikiema P.N., Worrillow L., Traore A.S., Wild C.P., Turner P.C., Fumonisin contamination of maize in Burkina Faso, West Africa, *Food Addit. Contam.* (2004) 21:865-870.
- [26] Oswald I., Comera C., Immunotoxicity of mycotoxins, *Rev. Med. Vet.* (1998) 149:585-590.
- [27] Oswald I.P., Desautels C., Laffitte J., Fournout S., Peres S.Y., Odin M., et al., Mycotoxin fumonisin B<sub>1</sub> increases intestinal colonization by pathogenic *Escherichia coli* in pigs, *Appl. Environ. Microbiol.* (2003) 69:5870-5874.

- [28] Peirson S.N., Butler J.N., Foster R., Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis, *Nucleic Acids Res.* (2003) 31:e73.
- [29] Pescovitz M.D., Lunney J.K., Sachs D.H., Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL, *J. Immunol.* (1984) 133:368-375.
- [30] Pestka J.J., Smolinski A.T., Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans, *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* (2005) 8:39-69.
- [31] Pinton P., Accensi F., Beauchamp E., Cossalter A.M., Callu P., Grosjean F., Oswald I.P., Ingestion of deoxynivalenol (DON) contaminated feed alters the pig vaccinal immune responses, *Toxicol. Lett.* (2008) 177:215-222.
- [32] Piva A., Casadei G., Pagliuca G., Cabassi E., Galvano F., Solfrizzo M., et al., Activated carbon does not prevent the toxicity of culture material containing fumonisin B1 when fed to weanling piglets, *J. Anim. Sci.* (2005) 83:1939-1947.
- [33] Rasschaert K., Verdonck F., Goddeeris B.M., Duchateau L., Cox E., Screening of pigs resistant to F4 enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infection, *Vet. Microbiol.* (2007) 123:249-253.
- [34] Royae A.R., Husmann R.J., Dawson H.D., Calzada-Nova G., Schnitzlein W.M., Zuckermann F.A., Lunney J.K., Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2004) 102:199-216.
- [35] Saalmüller A., Aasted B., Canals A., Dominguez J., Goldman T., Lunney J.K., et al., Analyses of mAb reactive with porcine CD8, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (1994) 43:249-254.
- [36] Stockmann-Juvala H., Alenius H., Savolainen K., Effects of fumonisin B(1) on the expression of cytokines and chemokines in human dendritic cells, *Food Chem. Toxicol.* (2008) 46:1444-1451.
- [37] Taranu I., Marin D.E., Bouhet S., Pascale F., Bailly J.D., Miller J.D., et al., Mycotoxin fumonisin B1 alters the cytokine profile and decreases the vaccinal antibody titer in pigs, *Toxicol. Sci.* (2005) 84:301-307.
- [38] Theumer M.G., Lopez A.G., Masih D.T., Chulze S.N., Rubinstein H.R., Immunobiological effects of fumonisin B1 in experimental subchronic mycotoxicoses in rats, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* (2002) 9:149-155.
- [39] Trinchieri G., Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity, *Nat. Rev. Immunol.* (2003) 3:133-146.
- [40] Turley S.J., Inaba K., Garrett W.S., Ebersold M., Unternaehrer J., Steinman R.M., Mellman I., Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells, *Science* (2000) 288:522-527.
- [41] Van den Broeck W., Cox E., Goddeeris B.M., Receptor-dependent immune responses in pigs after oral immunization with F4 fimbriae, *Infect. Immun.* (1999) 67:520-526.

- [42] Van den Broeck W., Cox E., Goddeeris B.M., Induction of immune responses in pigs following oral administration of purified F4 fimbriae, *Vaccine* (1999) 17:2020-2029.
- [43] Van Zaane D., Hulst M.M., Monoclonal antibodies against porcine immunoglobulin isotypes, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (1987) 16:23-36.
- [44] Verdonck F., Cox E., van Gog K., Van der Stede Y., Duchateau L., Deprez P., Goddeeris B.M., Different kinetic of antibody responses following infection of newly weaned pigs with an F4 enterotoxigenic *Escherichia coli* strain or an F18 verotoxigenic *Escherichia coli* strain, *Vaccine* (2002) 20:2995-3004.
- [45] Verdonck F., Cox E., Van der Stede Y., Goddeeris B.M., Oral immunization of piglets with recombinant F4 fimbrial adhesin FaeG monomers induces a mucosal and systemic F4-specific immune response, *Vaccine* (2004) 22:4291-4299.
- [46] Verdonck F., Joensuu J.J., Stuyven E., De Meyer J., Muilu M., Pirhonen M., et al., The polymeric stability of the *Escherichia coli* F4 (K88) fimbriae enhances its mucosal immunogenicity following oral immunization, *Vaccine* (2008) 26:5728-5735.
- [47] von der Hardt K., Kandler M.A., Fink L., Schoof E., Dotsch J., Brandenstein O., et al., High frequency oscillatory ventilation suppresses inflammatory response in lung tissue and microdissected alveolar macrophages in surfactant depleted piglets, *Pediatr. Res.* (2004) 55:339-346.
- [48] Whitaker T.B., Doko M.B., Maestroni B.M., Slate A.B., Ogunbanwo B.F., Evaluating the performance of sampling plans to detect fumonisin B1 in maize lots marketed in Nigeria, *J. AOAC Int.* (2007) 90:1050-1059.
- [49] Yang H., Oura C.A., Kirkham P.A., Parkhouse R.M., Preparation of monoclonal anti-porcine CD3 antibodies and preliminary characterization of porcine T lymphocytes, *Immunology* (1996) 88:577-585.
- [50] Zhang W., Wen K., Azevedo M.S., Gonzalez A., Saif L.J., Li G., et al., Lactic acid bacterial colonization and human rotavirus infection influence distribution and frequencies of monocytes/macrophages and dendritic cells in neonatal gnotobiotic pigs, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2008) 121:222-231.

### Figure legends

**Figure 1.** A) Mean fecal F4<sup>+</sup> *E. coli* (log 10) per gram feces ( $\pm$  SEM) following F4<sup>+</sup> ETEC infection of FB<sub>1</sub>-exposed (FB<sub>1</sub>, n = 5) and non-exposed animals (PBS, n = 5) at 1 to 9 days post infection (dpi). The asterisk indicates a significant difference ( $P < 0.05$ ) between both groups. B) Mean F4-specific IgM, C) IgG and D) IgA ASCs ( $\pm$  SEM) per  $5 \times 10^6$  MC in lamina propria (LP), mesenteric lymph nodes (MLN), jejunal (JPP) and ileal Peyer's patches (IPP) of control animals (PBS, n = 3), F4-immunized animals (F4, n = 3) and FB<sub>1</sub>-exposed and F4-immunized animals (F4+FB<sub>1</sub>, n = 3) at one week following immunization. Different letters indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) between groups: a) PBS-F4, b) PBS-F4+FB<sub>1</sub>, c) F4-F4+FB<sub>1</sub>.

**Figure 2.** The mean fold change of expressed cytokines to a combination of the housekeeping genes cyclophilin A,  $\beta$ -2-microglobulin and  $\beta$ -actin ( $\pm$  SD) in the lamina propria (LP), mesenteric lymph nodes (MLN), jejunal (JPP) and ileal Peyer's patches (IPP) of non-exposed animals (PBS, n = 3) or FB<sub>1</sub>-exposed animals (FB<sub>1</sub>, n = 3) at the end of the FB<sub>1</sub> administration period. The cytokine expression level is represented in fold change compared to the PBS group (mean value of 1). The asterisk indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) between both groups.

**Figure 3.** Increased expression of APC maturation markers MHC-II and CD80/86 on CD11R1<sup>+</sup> LP APC in response to stimulation with 50  $\mu$ g F4. (a) Forward and side scatter characteristics of enriched CD11R1<sup>+</sup> cells, consisting of APC and contaminating eosinophils. (b) Eosinophils do not express APC maturation markers. (c) Purified CD11R1<sup>+</sup> cells, gated on the APC population. One representative experiment out of 3 independent experiments is shown. (d) An isolated LP APC stained with anti-CD11R1 TexasRed, anti-MHC-II FITC and DAPI, bar = 10  $\mu$ m (e) Mean fluorescence intensity (MFI ( $\pm$  SD)) of isolated CD11R1<sup>+</sup> LP cells stained for CD80/86 and MHC-II expression and gated on the APC population from non-exposed (PBS, n = 3) or FB<sub>1</sub>-exposed animals (FB<sub>1</sub>, n = 3) following overnight stimulation with 50  $\mu$ g F4 (F4) or flagellin (Flag). The asterisk indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) between both groups; the letters indicate a significant difference between unstimulated (medium) and stimulated cells within groups.

**Table I.** Overview of the experimental design and analyses.

25 recently weaned piglets in experiment							
Day	Control animals <i>11 piglets</i>			FB <sub>1</sub> -treated animals <i>14 piglets</i>			
-10	<i>3 piglets</i>	<i>3 piglets</i>	<i>5 piglets</i>	<i>3 piglets</i>	<i>3 piglets</i>	<i>3 piglets</i>	<i>5 piglets</i>
Day 0	<u>Slaughter:</u> FCM MLR Cytokines APC	Oral F4 ↓	ETEC infection ↓	<u>Slaughter:</u> FCM MLR Cytokines APC	Oral F4 ↓	Oral PBS ↓	ETEC infection ↓
Day 7		<u>Slaughter:</u> mucosal ELISPOT	↓		<u>Slaughter:</u> mucosal ELISPOT	<u>Slaughter:</u> mucosal ELISPOT	↓
Day 9			Fecal ETEC excretion				Fecal ETEC excretion

FCM, Flow CytoMetry; MLR, Mixed Lymphocyte Reaction; APC, antigen presenting cells

**Table II.** Overview of the antibodies used in flow cytometry.

Specificity	Name	Isotype	Reference
CD2	MSA4	IgG2a	[29]
CD3	PTT3	IgG1	[49]
CD4	74-12-4	IgG2b	[29]
CD8	11/295/33	IgG2a	[35]
CD11R1	TMG6-5	IgG1	[13]
CD25	K231.3B2	IgG1	[1]
CD80/86	huCTLA-4 muIg fusion protein (Ansell, Bayport, MN, USA)	IgG2a	
CD172	74-22-15	IgG2b	[29]
MHC-II	MSA3	IgG2a	[19]
IgM	28.4.1	IgG1	[43]

hu, human; mu, murine

**Table III.** Nucleotide sequences of primers for real-time PCR.

Gene Symbol (gene bank accession number)	Primer sequence	Amplicon size
Cyclophilin A <sup>a</sup> (NM_214353)	F (600 nM) CCCACCGTCTTCTTCGACAT R (600 nM) TCTGCTGTCTTTGGAACCTTGTCT	92
2-microglobulin <sup>a</sup> (NM_213978)	F (900 nM) TTCTACCTTCTGGTCCACACTGA R (300 nM) TCATCCAACCCAGATGCA	162
-actin, [47] (AY550069)	F (300 nM) TCATCACCATCGGCAACG R (300 nM) TTCCTGATGTCCACGTCGC	133
IL-1 <sup>a</sup> (NM_001005149)	F (300 nM) GAGCTGAAGGCTCTCCACCTC R (300 nM) ATCGCTGTCATCTCCTTGACAC	87
IL-6 <sup>a</sup> (NM_214399)	F (900 nM) TTCACCTCTCCGGACAAAACCTG R (50 nM) TCTGCCAGTACCTCCTTGCTGT	122
IL-12p40 <sup>a</sup> (NM_214399)	F (300 nM) GGTTTCAGACCCGACGAACTCT R (900 nM) CATATGGCCACAATGGGAGATG	112
IL-18, [34] (NM_213997)	F (300 nM) CGTGTTTGAGGATATGCCTGATT R (300 nM) TGGTTACTGCCAGACCTCTAGTGA	107
TNF- $\alpha$ , [22] (NM_214022)	F (300 nM) ACTGCACTTCGAGGTTATCGG R (300 nM) GCGACGGGCTTATCTGA	118

<sup>a</sup> present study for reference.



**Table IV.** The stimulation index of proliferated allogeneic lymphocytes after coculture with graded numbers of CD11R1<sup>+</sup> LP cells, consisting of APC and eosinophils, isolated from FB<sub>1</sub>-exposed and non-exposed animals.

APC stimulation APC/ T cell ratio	Mean stimulation index		<i>p</i> -value
	Control animals	FB <sub>1</sub> -treated animals	
F4 stimulation			
1/10	38.60 ± 6.18	1.33 ± 0.75	< 0.05
1/30	13.12 ± 1.16	1.10 ± 0.07	< 0.001
1/90	17.92 ± 2.20	0.97 ± 0.09	< 0.01
1/270	6.63 ± 1.41	0.95 ± 0.71	0.08
Flagellin stimulation			
1/10	71.92 ± 15.94	2.84 ± 1.64	< 0.05
1/30	30.30 ± 5.54	1.65 ± 0.20	< 0.01
1/90	41.02 ± 8.28	1.13 ± 0.46	< 0.01
1/270	9.84 ± 2.99	0.86 ± 0.33	< 0.05

Mean ± SD (n = 3). CD11R1<sup>+</sup> cells were incubated overnight with either F4 or flagellin to induce activation. The SI was calculated by dividing the individual cpm values of every condition by the mean cpm value of the control coculture (untreated CD11R1<sup>+</sup> cells and lymphocytes). SI from both negative controls, CD11R1<sup>+</sup> cells and lymphocytes alone, were lower than 1.5.

**Figure 1.**

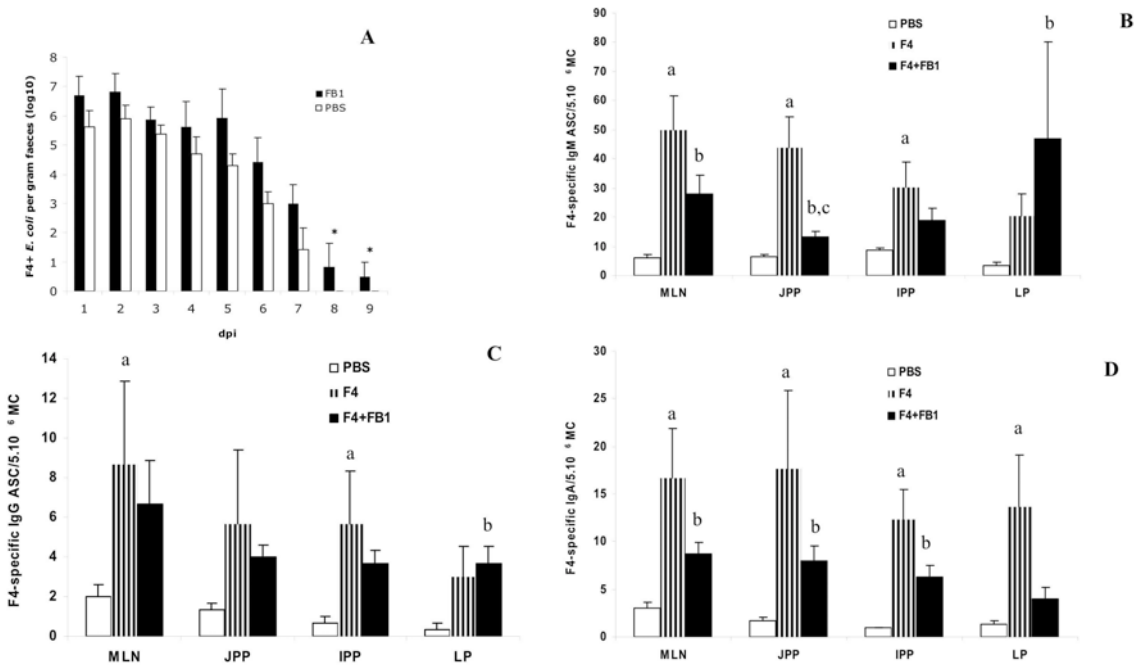
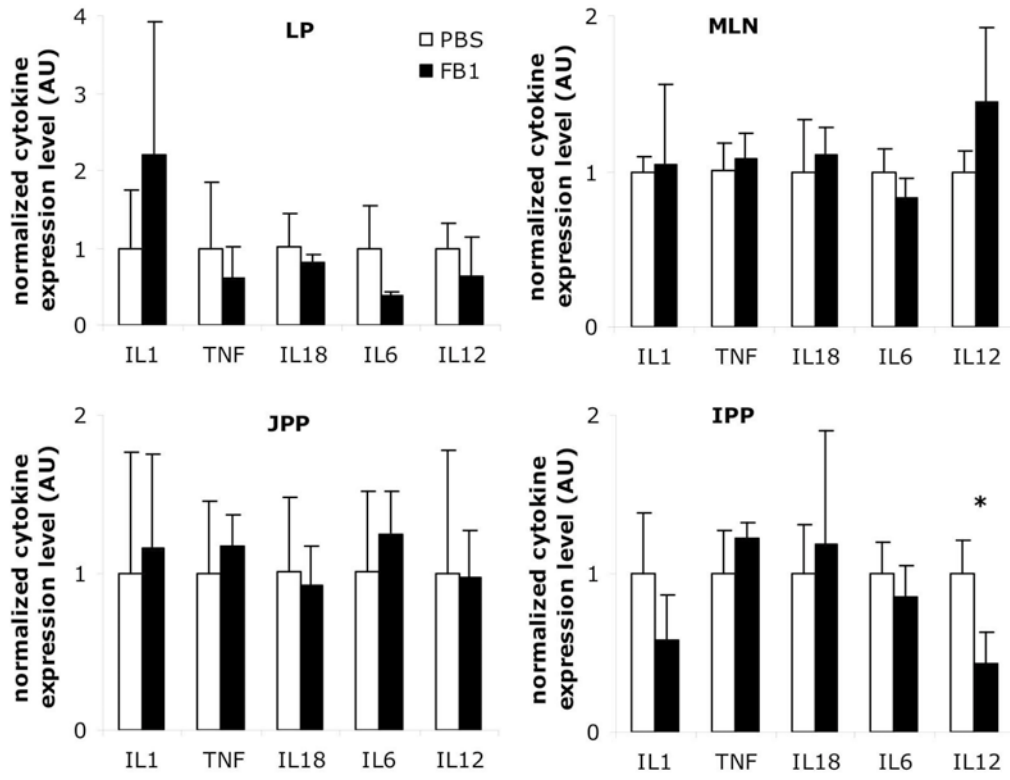
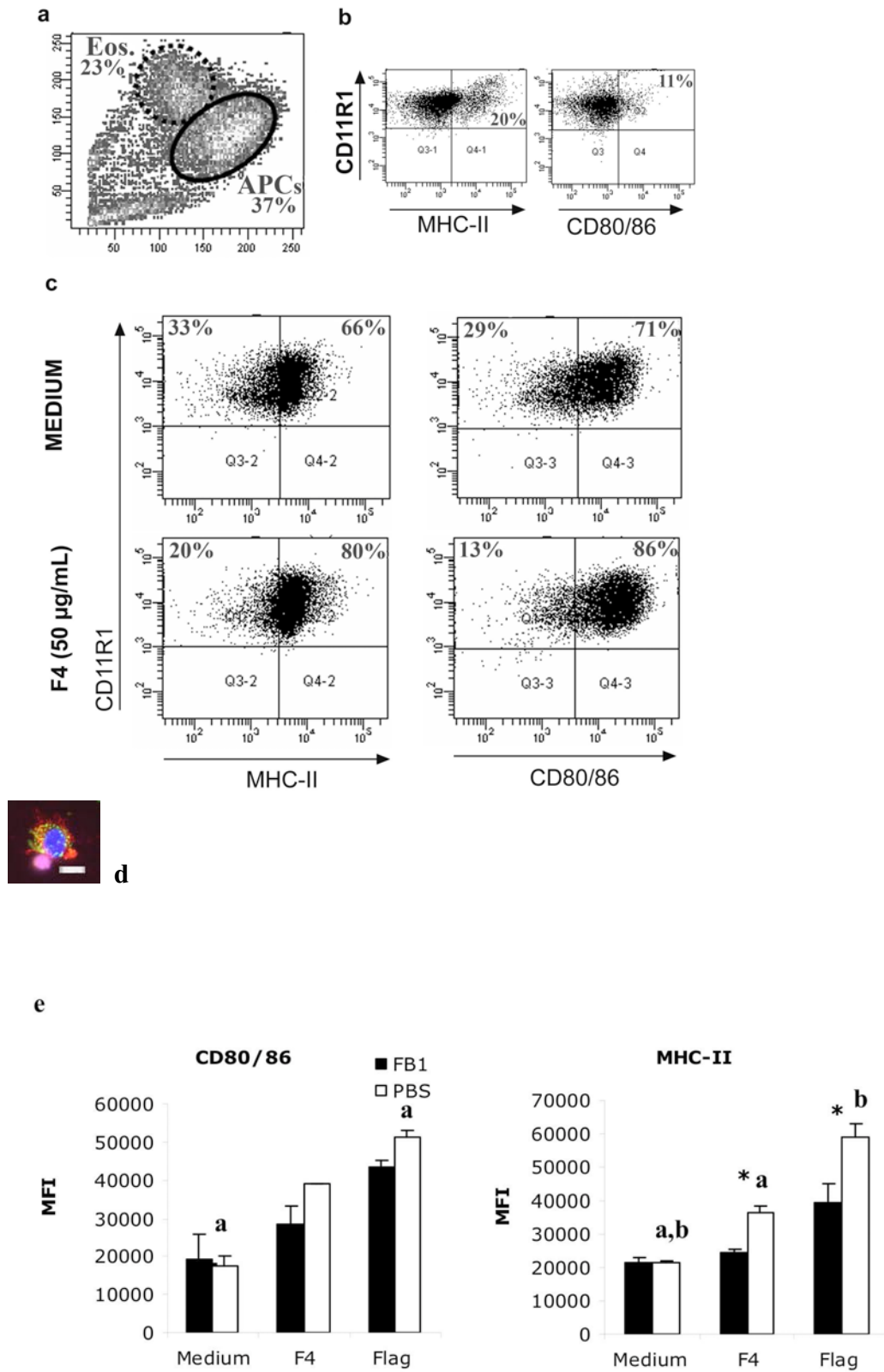


Figure 2



**Figure 3**





**AUTEUR:** Yann WACHÉ

**TITRE: TOXICOLOGIE DU DÉOXYNIVALÉNOLE CHEZ LE PORC : EFFETS SUR LA RÉPONSE IMMUNITAIRE, LA FLORE INTESTINALE ET LA SENSIBILITÉ AUX PATHOGÈNES**

**DIRECTEUR DE THESE:** Dr. Isabelle Oswald

---

**RESUME:**

Le déoxynivalénol (DON) est une mycotoxine issue du métabolisme secondaire de moisissures, et se retrouve fréquemment comme contaminant naturel de nombreuses denrées d'origine végétale. Les objectifs de nos travaux ont été d'évaluer les propriétés toxiques du DON chez le porc en croissance, sain ou porteur d'agent pathogène, car cette espèce est connue pour sa sensibilité envers la toxine. Nous avons dans un premier temps étudié *in vitro* les effets du DON sur la réponse immunitaire non spécifique des animaux. Dans un deuxième temps, l'impact de l'ingestion d'un aliment naturellement contaminé sur les performances et la flore intestinale des porcs a été étudié. Enfin, le modèle de portage asymptomatique de salmonelles a été choisi pour caractériser l'effet de l'intoxication sur l'excrétion de ce pathogène. En fonction de la dose de DON utilisée (0,5 - 5 $\mu$ M), la pré-exposition des macrophages à la toxine a entraîné une inhibition de leur activation par l'IFN- $\gamma$  à travers une diminution de l'expression de leurs récepteurs transmembranaires CD14, CD54, CD119 et HLA-DP/DQ/DR, impliqués dans les fonctions de coopération et de signalisation des macrophages. En revanche, le DON n'a pas eu d'effet particulier sur des macrophages préalablement activés par l'IFN- $\gamma$ . L'exposition au DON n'a pas altéré la capacité de phagocytose des neutrophiles. Cependant, le DON (10 - 50  $\mu$ M) réduit les propriétés de migration de ces cellules, et diminue la production d'IL-8 par les neutrophiles stimulés par du lipopolysaccharide. Nos résultats suggèrent que la diminution de la production d'IL-8 serait due à une inhibition de l'expression de la sous-unité p65 des facteurs de transcription- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Dans les études *in vivo*, nous avons observé une diminution transitoire de la croissance de tous les porcs après une semaine d'ingestion d'un aliment contaminé par le DON (2,7 mg DON/kg d'aliment). Des modifications de profils de flore bactérienne intestinale ont également été mises en évidence par CE-SSCP (Capillary Electrophoresis Single-Stranded Conformation Polymorphism) après 28 jours d'intoxication chronique. Comme attendu, aucun signe clinique ou physiologique important n'a été observé suite à l'inoculation des porcs avec 10<sup>6</sup> UFC de *Salmonella* Typhimurium, hormis une augmentation immédiate de la concentration sérique des immunoglobulines A. Une légère accélération de la séroconversion des animaux infectés par *Salmonella* Typhimurium et exposés au DON a été observée, ainsi qu'une perturbation passagère de la population de coliformes thermotolérants des fécès, deux jours après l'infection. Aucun autre effet synergique de l'intoxication et de l'infection n'a été observé sur la persistance et l'excrétion de la bactérie par les porcs infectés.

En conclusion, nos résultats montrent qu'*in vitro*, le DON diminue les fonctions des cellules phagocytaires (neutrophiles et macrophages) et qu'*in vivo*, aux doses de DON et de salmonelles administrés, cette mycotoxine altère la flore intestinale des porcs, mais ne semble pas être un facteur aggravant du portage asymptomatique de salmonelles.

---

**MOTS-CLES:** Déoxynivalénol, Mycotoxine, Porc, Système immunitaire, Macrophages, Neutrophiles, Marqueurs de différenciation, Flore intestinale, CE-SSCP, Salmonelles.