

Impact des mycotoxines sur le microbiote intestinal humain, cas particulier du déoxynivalénol

Manuel Saint-Cyr

▶ **To cite this version:**

Manuel Saint-Cyr. Impact des mycotoxines sur le microbiote intestinal humain, cas particulier du déoxynivalénol. Alimentation et Nutrition. Université Rennes 1, 2013. Français. NNT : rennes1-ori-wf-1-6029 . tel-00960199

HAL Id: tel-00960199

https://theses.hal.science/tel-00960199

Submitted on 17 Mar 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNÉE 2013

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie et Sciences de la Santé

Ecole doctorale Vie, Agro, Santé

présentée par

Manuel Saint-Cyr

Préparée à l'unité de recherche AB2R
Antibiotiques, Biocides, Résidus et Résistance
Anses, Laboratoire de Fougères

Impact des Mycotoxines sur le Microbiote Intestinal Humain, cas particulier du Déoxynivalénol

Thèse soutenue à Rennes
le 18 décembre 2013

devant le jury composé de :

Catherine MAGRAS-RESCH
PU ENV Oniris Nantes / *rapporteur*

Jean-Denis BAILLY
MC ENV INRA/INP/UPS Toulouse / *rapporteur*

Anne-Judith WALIGORA
MC Univ Paris Descartes / *examinateur*

Sylviane DRAGACCI
DR Anses Maisons-Alfort / *examinateur*

Thierry DUPONT
Directeur scientifique Qualilab / *examinateur*

Pascal LE-CORRE
PU-PH Univ Rennes 1 / *examinateur*

Agnès PERRIN-GUYOMARD
IE Anses Fougères / co-encadrante *de thèse*

Michel LAURENTIE
DR Anses Fougères / *directeur de thèse*

Remerciements

Ce travail de thèse réalisé au laboratoire de Fougères a été financé par l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire dans le cadre de sa mission d'évaluation des risques.

J'adresse toute ma reconnaissance à Michel Laurentie, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueilli dans l'équipe et m'avoir fait confiance afin d'entreprendre ces travaux de thèse. Merci de m'avoir accompagné tout au long de cette thèse, des balbutiements des premières expérimentations animales aux dernières corrections de ce manuscrit. J'ai beaucoup appris de tes qualités scientifiques mais aussi humaines.

Merci également, à Agnès Perrin-Guyomard d'avoir co-encadré ce travail, de m'avoir consacré du temps pour la rédaction, la réalisation, les analyses et la correction des travaux de recherche entrepris.

Mes deux "chefs" vous avez fait de ces trois années, une expérience scientifique et personnelle enrichissante, et m'avez fourni les outils et compétences nécessaires pour ma future insertion professionnelle.

J'exprime aussi ma reconnaissance aux membres de mes comités de thèse qui m'ont apporté de précieux conseils et permis le bon déroulement de cette thèse : Christine Burel, Pascal Le-Corre, Olivier Firmeisse et Gwenaël Jan qui durant trois ans a joué le rôle de tuteur de thèse pour l'école doctorale Vie Agro Santé que je remercie également.

Je remercie Paméla Houée, Jean-Guy Rolland, Jacqueline Manceau et Jean-Michel Delmas pour leur précieuse aide technique au cours de cette thèse.

Bien évidemment, derrière ce manuscrit se cachent les personnes de l'ombre qui permettent de surmonter les difficultés administratives et logistiques. Je remercie donc chaleureusement Anne, Lucie, Alexia, Danièle, Stéphanie et Roselyne, et bien sur Marie-Pierre et Hélène du pôle assistante.

Je remercie également tous les collègues qui ont rendu mon quotidien rempli de rires et de gâteaux. Notamment Mélaine même si elle mange vraiment n'importe quoi.

Je remercie MKL, le monsieur Klité du labo et Nathalie la miss Communication.

J'adresse ma gratitude aux donneurs qui ont rendu possible mes expériences.

Une spéciale dédicace aux autres thésards de l'Anses Malek et Pèj 2 énormes trolls pour les discussions philosophiques très enrichissantes sur tout et n'importe quoi.

Je remercie les stagiaires de passage (Lucie, Doriane, Steven, Nicolas, Jimmy, Gwen, Sarah, David, Sylvain) qui ont amené un vent de fraîcheur et de dynamisme au sein du labo.

Un énorme merci aux 3 GROSSES pas drôles de dames du labo Adeline, Pam et Rachou pour leur aide et leur soutien tout au long de ces 3 années de thèse.

Et il y a le reste du monde, François, les gros (Simon, Mathieu, Ben, Blackos, Quentin) les grosses (Lydia, Sandrine) et les blondes (Paupau, Soso, Nono, Gwen, Kelig, Saracroch', Fanny, Marie, Chocapic, Lisa) qui ne comprennent pas grand-chose à ce que je fais mais avec qui je partage ma passion du handball à l'AGL Handball Fougères. Je remercie aussi le club de m'avoir donné plus de responsabilités et de confiance en moi.

Sans le soutien de mes proches et de ma famille je n'en serai pas là aujourd'hui, merci infiniment de m'avoir donné un environnement propice à l'accomplissement de soi. Merci à mes parents d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir poussé à aller toujours plus loin.

Un hommage à mon cousin Ludo qui nous a malheureusement quittés trop tôt… On ne t'entendra plus, on ne te verra plus… Maintenant tu brilles comme une étoile...

"Les aigles ne volent pas avec les pigeons."

Booba

Liste des communications

Communications affichées

-**Saint-Cyr, M.J.**, Perrin-Guyomard, A., Manceau, J., Rolland, J.-G., Laurentie, M Impact des Mycotoxines sur le Microbiote Intestinal Humain, cas particulier du Déoxynivalénol (DON). Journée des Doctorants et Post-doctorants de l'Anses, Maisons-Alfort, France, 28-29/11/2013.

-**Saint-Cyr, M.J.**, Perrin-Guyomard, A., Houée, P., Rolland, J.-G., Laurentie, M., Soumet, C. Utilisation de rongeurs à flore humanisée ou porcine dans le cadre de l'évaluation des effets de contaminants alimentaires sur le microbiote. 2ème journée d'étude du pôle santé et société Maisons-Alfort, France, 05/11/2013.

-**Saint-Cyr, M.J.**, Cadieu, N., Perrin-Guyomard, A., Laurentie, M. Système de Management de la Qualité en Recherche Appliqué aux Travaux de Thèse au Laboratoire de l'Anses Fougères accrédité ISO 17025. École qualité en Recherche et en Enseignement Supérieur, Montpellier, France, 09-11/11/2013.

-**Saint-Cyr, M.J.**, Perrin-Guyomard, A., Manceau, J., Rolland, J.-G., Laurentie, M. The Human Gut Microbiota: Potential Target Of Deoxynivalenol, A Major Mycotoxin Involved In Food Contamination. Journée des doctorants et post doctorants en Biologie-Santé en Bretagne, Brest, France, 21/06/2013.

-**Saint-Cyr, M.J.**, Perrin-Guyomard, A., Manceau, J., Rolland, J.-G., Laurentie, M. Evaluation Of An Oral Chronic Exposure Of Deoxynivalenol On The Composition Of The Human Gut Microbiota. Young Researchers in Life Sciences Conference, Paris, France, 22-24/05/2013. **Prix de la meilleure présentation**

-**Saint-Cyr, M.J.**, Perrin-Guyomard, A., Manceau, J., Rolland, J.-G., Laurentie, M Impact des Mycotoxines sur le Microbiote Intestinal Humain, cas particulier du Déoxynivalénol (DON). Journée des Doctorants et Post-doctorants de l'Anses, Maisons-Alfort, France, 22/10/2012.

-Manceau, J., **Saint-Cyr, M.J.**, Perrin-Guyomard, A., Rolland, J.-G., Laurentie. Accuracy Profile: A Specific Tool For Validation Diagnostic. 12th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology Noorwijkerhout, Pays-Bas, 08-12/07/2012.

-**Saint-Cyr, M.J.**, Perrin-Guyomard, A., Manceau, J., Rolland, J.-G., Laurentie. Feasibility Kinetic Study Of Deoxynivalenol In Pigs At The NOEL Dose. 12th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, Noorwijkerhout, Pays-Bas, 08-12/07/2012.

-**Saint-Cyr, M.J.**, Perrin-Guyomard, A., Manceau, J., Rolland, J.-G., Laurentie. Impact of deoxynivalenol (DON) on the human gut microbiota in an animal model of gnotobiotics rats. Doctoral college on Environment and Health, Rennes, France, 04-06/06/2012.

Communications écrites

-**Saint-Cyr, M.J.**, Perrin-Guyomard, A., Manceau, J., Rolland, J.-G., Laurentie, M. Assessment of deoxynivalenol absolute oral bioavailability in pigs and rats. TOXICOLOGY LETTERS. Being submitted.
-**Saint-Cyr, M.J.**, Perrin-Guyomard, A., Houée, P., Rolland, J.-G., Laurentie, M. Evaluation of an Oral Subchronic Exposure of Deoxynivalenol on the Composition of Human Gut Microbiota in a Model of Human Microbiota-Associated Rats. PLoS ONE 8(11): e80578. doi:10.1371/journal.pone.0080578.

-**Saint-Cyr, M.J.**, Perrin-Guyomard, A., Houée, P., Rolland, J.-G., Laurentie, M. Use of accuracy profile procedure to validate a real-time PCR method to quantify bacteria in feces. Journal of AOAC INTERNATIONAL Volume 97 #2 March/April 2014.

Communications orales

-**Saint-Cyr, M.J.**, Perrin-Guyomard, A., Houée, P., Manceau, J., Rolland, J.-G., Laurentie, M Impact des Mycotoxines sur le Microbiote Intestinal Humain, cas particulier du Déoxynivalénol (DON). Journée des Doctorants et Post-doctorants de l'Anses, Maisons-Alfort, France, 28-29/11/2013.

Liste des abréviations

3-A-DON	3 acétyl déoxynivalénol
15-A-DON	15 acétyle déoxynivalénol
AFSSA	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AGCC	acides gras à chaîne courte
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
CCM	Chromatographie en couche mince
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
D3G	Déoxynivalénol 3 glucoside
DGGE/ TGGE	Denaturing/Temperature Gradient Gel Electrophoresis (en) ; Electrophorèse sur Gel en Gradient (de Température) Dénaturant (fr)
DJT	Dose journalière tolérable
DOM	Dé-époxynivalénol
DON	Déoxynivalénol
DONGlu	Déoxynivalénol glucuronide
EAT	Étude de l’alimentation totale
FAO	Food and Agriculture Organization (en) ; Organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture (fr)
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (en) Comité d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires (fr)
LOD/LOQ	Limite de détection/limite de quantification
MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MIH	Microbiote intestinal humain
NOAEL	No observed adverse effect level (en) ; Dose sans effet toxique observable (fr)
qPCR	PCR quantitative
SCF	Scientific Committee on Food (en) ; Comité scientifique de l'alimentation humaine (fr)
SM	Spectrométrie de masse
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism (en) ; Polymorphisme de conformation des simples brins (fr)
$T_{1/2}$	Temps de demi-vie
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (en) ; Polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (fr)
Th1/2/3	Lymphocyte T helper
UFC	Unité Formant Colonie
WHO	World Health Organization (en) ; Organisation Mondiale de la Santé (fr)

Liste des figures

Figure 1 :	Prévalence des mycotoxines dans le monde entre 2005 et 2012.	page 2
Figure 2 :	Exemples de mycotoxines retrouvées dans les aliments.	page 4
Figure 3 :	Prévalence globale des produits contaminés par les mycotoxines dans le monde.	page 6
Figure 4 :	Étapes de la procédure d'évaluation du risque.	page 8
Figure 5 :	Comparaison entre du blé sain à gauche et du blé atteint de la fusariose à droite.	page 10
Figure 6 :	Structure chimique générale du déoxynivalénol.	page 10
Figure 7 :	Effets du DON sur les systèmes immunitaire, neuro-endocrinien et intestinal.	page 14
Figure 8 :	Métabolisme et excrétion du déoxynivalénol dans l'organisme.	page 20
Figure 9 :	Exposition au déoxynivalénol de la population française (adultes et enfants) en fonction des denrées alimentaires.	page 24
Figure 10 :	Interactions possibles entre un xénobiotique (trichothécènes) et les micro-organismes.	page 29
Figure 11 :	Métabolisme du déoxynivalénol par les bactéries.	page 31
Figure 12 :	Diversité des phyla dominants le long du tractus gastro intestinal.	page 37
Figure 13 :	Distribution et abondance des bactéries dans le tractus digestif.	page 37
Figure 14 :	Principales fonctions bénéfiques du microbiote intestinal humain.	page 39
Figure 15 :	Techniques utilisées pour étudier le microbiote intestinal.	page 43
Figure 16 :	Intervalle de quantification de différentes techniques moléculaires.	page 47
Figure 17 :	Cibles et approches « Méta-Omiques » associées pour l'étude des communautés microbiennes.	page 49
Figure 18 :	Cycle de vie d'une méthode analytique en physico chimie.	page 51
Figure 19 :	Comparaison de procédures de validation.	page 51
Figure 20 :	Protocole expérimental réalisé pour les études de cinétique du DON chez le rat et chez le porc.	page 64
Figure 21 :	Protocole expérimental réalisé pour la validation de la qPCR.	page 100
Figure 22 :	Protocole expérimental réalisé pour l'étude d'impact du DON sur le microbiote intestinal.	page 112
Figure 23 :	Perspectives aux travaux de thèse.	page 125
Figure 24 :	Approche conceptuelle pour déterminer une dose microbiologique journalière admissible adaptée de la directive GL36 du VICH.	page 128
Figure 25 :	Formes masquées du déoxynivalénol.	page 130
Figure 26 :	Métabolisme du déoxynivalénol et de ses formes masquées dans l'organisme après une ingestion par voie orale.	page 132

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Mycotoxines et champignons producteurs.	page 2
Tableau 2 :	Effets des principales mycotoxines et mécanismes d'action identifiés lors d'études *in vitro*.	page 4
Tableau 3	Effets physiologiques associés à une exposition au DON sur les systèmes intestinal, immunitaire et neuro-endocrinien en fonction de la dose.	page 16
Tableau 4	Limites maximales de DON pour le grain et les denrées alimentaires à destination de l'alimentation humaine.	page 18
Tableau 5 :	Principales caractéristiques cinétiques du déoxynivalénol en fonction de l'espèce animale.	page 18
Tableau 6 :	Estimation de l'exposition totale au DON et contribution des produits sélectionnés chez l'Homme (évaluations du JECFA de 2001 et de 2010).	page 22
Tableau 7 :	Expositions moyennes au DON de la population française (Études d'Alimentation Totale (EAT) 1 et 2).	page 22
Tableau 8 :	Études montrant des interactions entre les bactéries et le DON.	page 29
Tableau 9 :	Résumé des différentes approches d'étude du microbiote intestinal.	page 45
Tableau 10 :	Exemples de maladies associées à une dysbiose du MIH.	page 55
Tableau 11 :	Avantages et inconvénients des modèles expérimentaux utilisés au cours de la thèse dans le cadre de l'évaluation de l'impact du DON sur le microbiote intestinal humain.	page 125
Tableau 12 :	Études *in vitro* et *in vivo* mettant en évidence la transformation du D3G en DON.	page 130

Table des matières

Introduction 1

Le Déoxynivalénol 7

1 Identification 11
1.1 Origine et répartition 11
1.2 Propriétés physico-chimiques et cibles moléculaires 11
1.3 Effets sur la santé humaine 12
1.4 Méthodes d'analyse 12

2 Caractérisation 15
2.1 Effets toxicologiques 15
2.2 Cinétique du DON 19
2.2.1 Absorption 19
2.2.2 Distribution 19
2.2.3 Métabolisme 21
2.2.4 Élimination 21

3 Exposition 23
3.1 Monde 23
3.2 France 23

4 Prévention 25
4.1 Gestion « pré-récolte » 25
4.2 Gestion « post-récolte » 26

5 Conclusion 27

Interactions Déoxynivalénol/Bactéries 28

1 Action des bactéries sur le DON 30
1.1 Dégradation du DON 30
1.1.1 Écosystèmes microbiens 30
1.1.2 Bactérie isolée 32
1.2 Adsorption du DON 32
1.3 Application 33

2 Action du DON sur les bactéries 34
2.1 Action sur les fonctions métaboliques 34
2.2 Action sur l'équilibre du microbiote 34

3 Conclusion 35

Le Microbiote Intestinal Humain 36

1 Écologie 38
1.1 Composition 38
1.2 Fonctions 40
1.2.1 Fonctions métaboliques essentielles 40
1.2.2 Intervention dans le développement cellulaire intestinal 41
1.2.3 Microbiote intestinal et le système immunitaire 41
1.2.4 Rôle dans la protection de l'hôte 41

2 Caractérisation de l'écosystème intestinal bactérien 44
2.1 Méthodes culturales 44
2.2 Techniques d'empreintes moléculaires 44
2.3 Hybridation 46
2.3.1 Hybridation fluorescente *in situ* (FISH) 46
2.3.2 Puces phylogénétiques (biopuces, puces à ADN) 48
2.4 PCR en temps réel (qPCR) 48
2.5 Pyroséquençage 50
2.6 Métagénomique 50
2.7 Validation des méthodes 52

3 Déséquilibre du microbiote intestinal 54
3.1 Causes 54
3.1.1 L'alimentation 54
3.1.2 Les médicaments 54
3.1.3 Le stress 56
3.2 Conséquences 56
3.2.1 Obésité 56
3.2.2 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) 57

4 Conclusion 58

Problématique 59

Résultats 62

Discussion et Perspectives 124

Références 133

Annexe 1 147
Annexe 2 156

Introduction

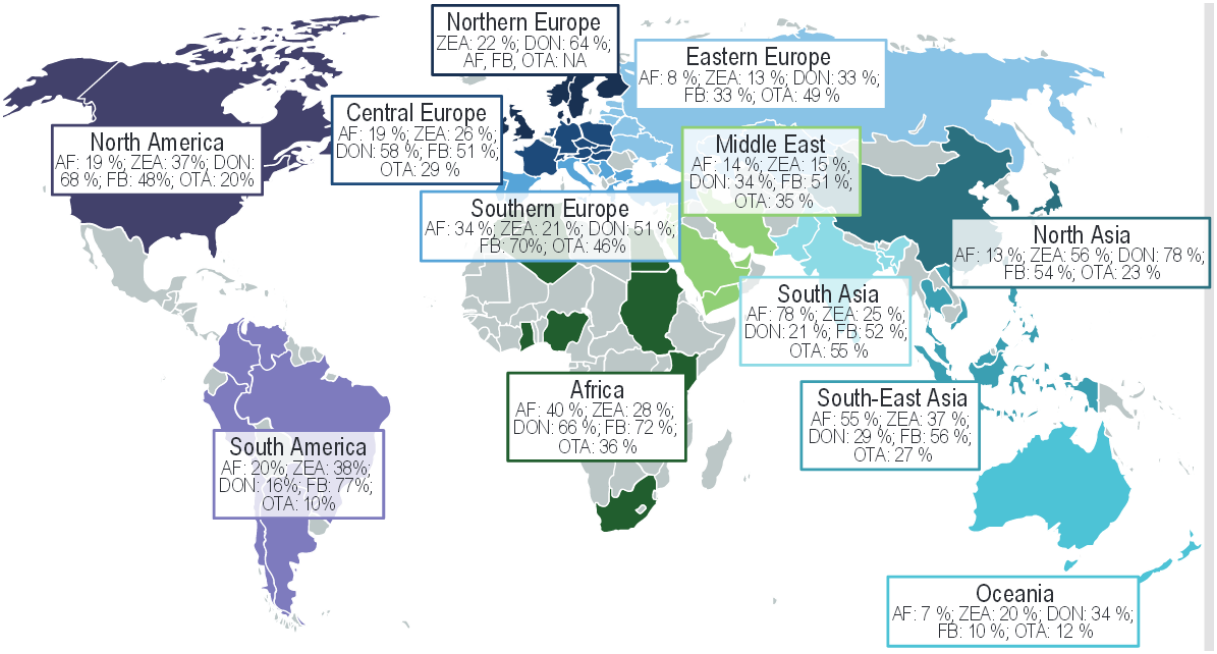


Figure 1 : Prévalence des mycotoxines dans le monde entre 2005 et 2012 [1]. Données issues de 19 000 échantillons analysés (céréales et produits transformés destinés à l'alimentation animale). AF : aflatoxines, ZEA : zéaralénone, DON : déoxynivalénol, FB : fumonisines, OTA : ochratoxine A.

Tableau 1 : Mycotoxines et champignons producteurs.

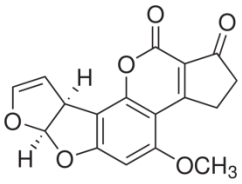
Mycotoxines	Champignons
Aflatoxines	*A*. flavus; A. parasiticus*
Fumonisines	*F*. verticillioides; F. proliferatum*
Ochratoxine A	*A. ochraceus; A. carbonarius; Penicillium verrucosum*
Trichothécènes	*F. graminearum, F. culmorum, F. crookwellense, F. sporotrichioides, F. poae, F. tricinctum, F. acuminatum*
Zéaralénone	*F. culmorum; F. graminearum*
Alcaloïdes d'ergot	*Claviceps purpurea*

*A : Aspergillus ; F : Fusarium.

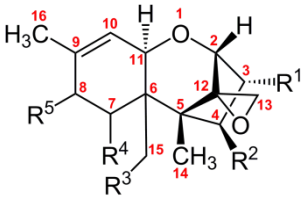
Chaque année, les cultures de céréales sont contaminées par les mycotoxines dans la plupart des régions du monde avec une fréquence et un niveau de concentration variables en fonction des différents pays (figure 1). L'Organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture estime que 25% des produits agricoles dans le monde sont contaminés par des mycotoxines, entraînant des pertes économiques importantes [2]. Ce problème est de plus en plus courant notamment en raison des changements climatiques importants. Ces contaminants naturels sont des métabolites secondaires produits par des champignons filamenteux (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, …) (tableau 1) qui se développent principalement sur les céréales au champ ou durant le stockage des grains après la récolte [3]. En outre, elles peuvent subsister dans l'environnement malgré la disparition des moisissures qui les ont produites. Les mycotoxines les plus connues sont les aflatoxines, les fumonisines, l'ochratoxine, la zéaralénone, les trichothécènes et les alcaloïdes de l'ergot (figure 2) [4].

Capable de résister aux procédés de transformation subies par les céréales, les mycotoxines peuvent se retrouver alors dans ces matières premières ainsi que dans les denrées alimentaires transformées destinées à l'Homme (pâtes, pain, bières) et à l'animal (granulés) à des concentrations pouvant dépasser les limites maximales recommandées. Dans ce cas, les mycotoxines représentent un risque dont les conséquences sanitaires dépendent de la teneur et de la nature en mycotoxine. La caractérisation du danger lié à la présence de mycotoxines dans l'alimentation prend en compte des données toxicologiques. Les études *in vitro* ont permis de mettre en évidence, selon les mycotoxines, des effets tératogènes, cancérigènes, ostrogéniques ou immuno-suppresseurs précisés dans le tableau 2 [5]. Leur stabilité leur permet d'entrer dans la chaîne alimentaire tout en conservant leurs propriétés toxiques. Un certain nombre de mycotoxines seraient également impliquées dans l'apparition de maladies chez l'Homme [6]. Chez les animaux de rente, tels que les bovins laitiers, les porcs et les volailles, la contamination par les mycotoxines, réduit la consommation et le taux de reproduction, altère la résistance aux maladies infectieuses, réduit l'efficacité de la vaccination, et induit des dommages pathologiques dans le principal organe cible le foie et mais aussi dans d'autres organes comme l'intestin et la rate [7].

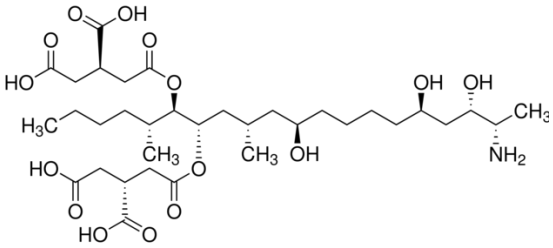
Les trichothécènes font partie des mycotoxines présentant un risque élevé d'un point de vue agro-alimentaire et sanitaire. Dans cette famille de mycotoxines, le déoxynivalénol (DON) est la toxine la plus fréquemment retrouvée dans les céréales comme l'indique la figure 3. Comme pour les autres mycotoxines, la caractérisation du danger associé à une exposition au DON repose sur des données toxicologiques.



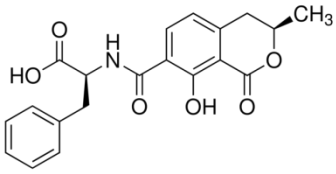
Aflatoxine B1



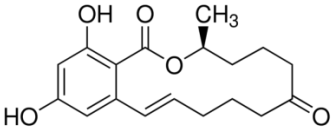
Trichothécènes



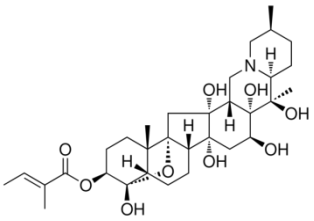
Fumonisine B



Ochratoxine B



Zéaralénone



Alcaloïdes vératrine

Figure 2 : Exemples de mycotoxines retrouvées dans les aliments.

Tableau 2 : Effets des principales mycotoxines et mécanismes d'action identifiés lors d'études *in vitro*.

Mycotoxines	Effets	Mécanismes d'action
Aflatoxines	-Hépatotoxicité -Génotoxicité -Cancérogénicité -Immunomodulation	-Formation d'adduit à l'ADN -Peroxydation lipidique -Bioactivation par cytochromes P450 -Conjugaison aux GS-transférases
Fumonisines	-Lésion du système nerveux central -Hépatotoxicité -Génotoxicité -Immunomodulation	-Inhibition de la synthèse de céramide -Altération du rapport sphinganine/sphingosine -Altération du cycle cellulaire
Ochratoxine A	-Néphrotoxicité -Génotoxicité -Immunomodulation	-Impact sur la synthèse des protéines. -Inhibition de la production d'ATP -Détoxification par les peptidases
Trichothécènes	-Hématotoxicité -Immunomodulation -Toxicité cutanée	-Induction de l'apoptose sur progéniteur hématopoïétique et cellules immunitaires -Impact sur la synthèse des protéines -Altération des immunoglobulines
Zéaralénone	-Fertilité et Reproduction	-Liaison aux récepteurs œstrogéniques -Bioactivation par des réductases -Conjugaison aux glucuronyltransférases

L’ingestion de ce contaminant alimentaire expose le microbiote intestinal à des concentrations en mycotoxine dont les effets sont à l’heure actuelle peu connus voire inconnus. Pourtant, le microbiote intestinal participe au bon fonctionnement du tractus digestif et à la santé de l’hôte, et une perturbation ou un déséquilibre de cet écosystème peut altérer ses fonctions protectrices. Il apparait donc important d’évaluer le risque associé à une exposition à ce contaminant naturel sur le microbiote intestinal de l’Homme.

Dans le cadre de sa mission de protection du consommateur, l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (Anses) a donc souhaité évaluer l'impact d'une contamination alimentaire au DON sur le microbiote intestinale humain (MIH). Dans ce contexte la partie bibliographique de ce travail vise à présenter i) le DON, ii) les interactions entre le DON et les bactéries, et enfin iii) le microbiote intestinal et ses fonctions.

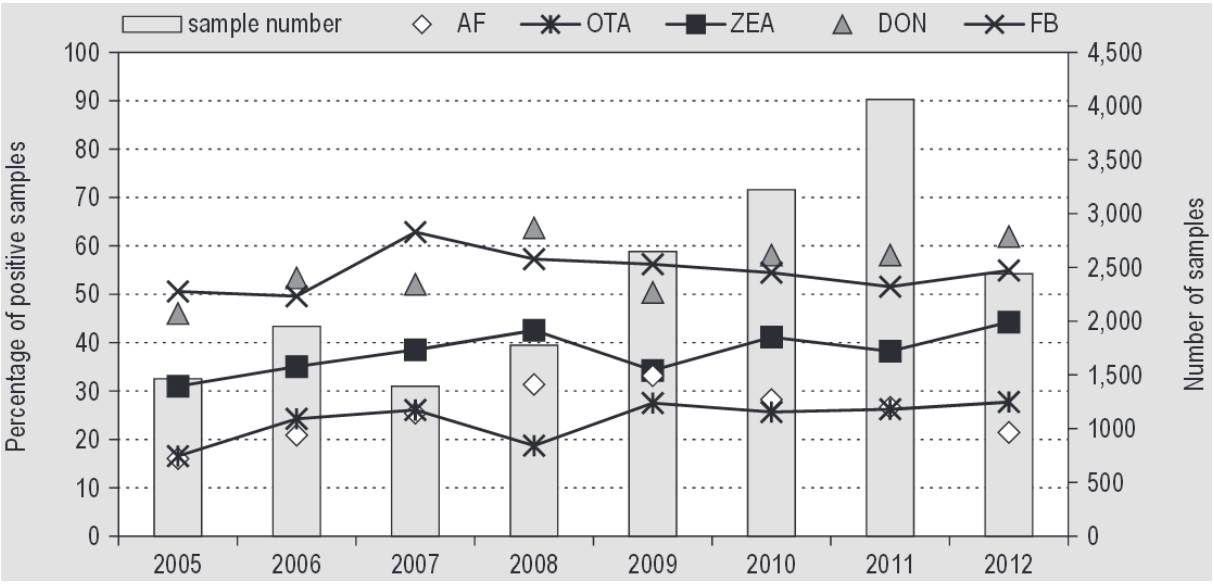


Figure 3 : Prévalence globale des produits contaminés par les mycotoxines dans le monde [1]. AF : aflatoxines, ZEA : zéaralénone, DON : déoxynivalénol, FB : fumonisines, OTA : ochratoxine A.

Le Déoxynivalénol

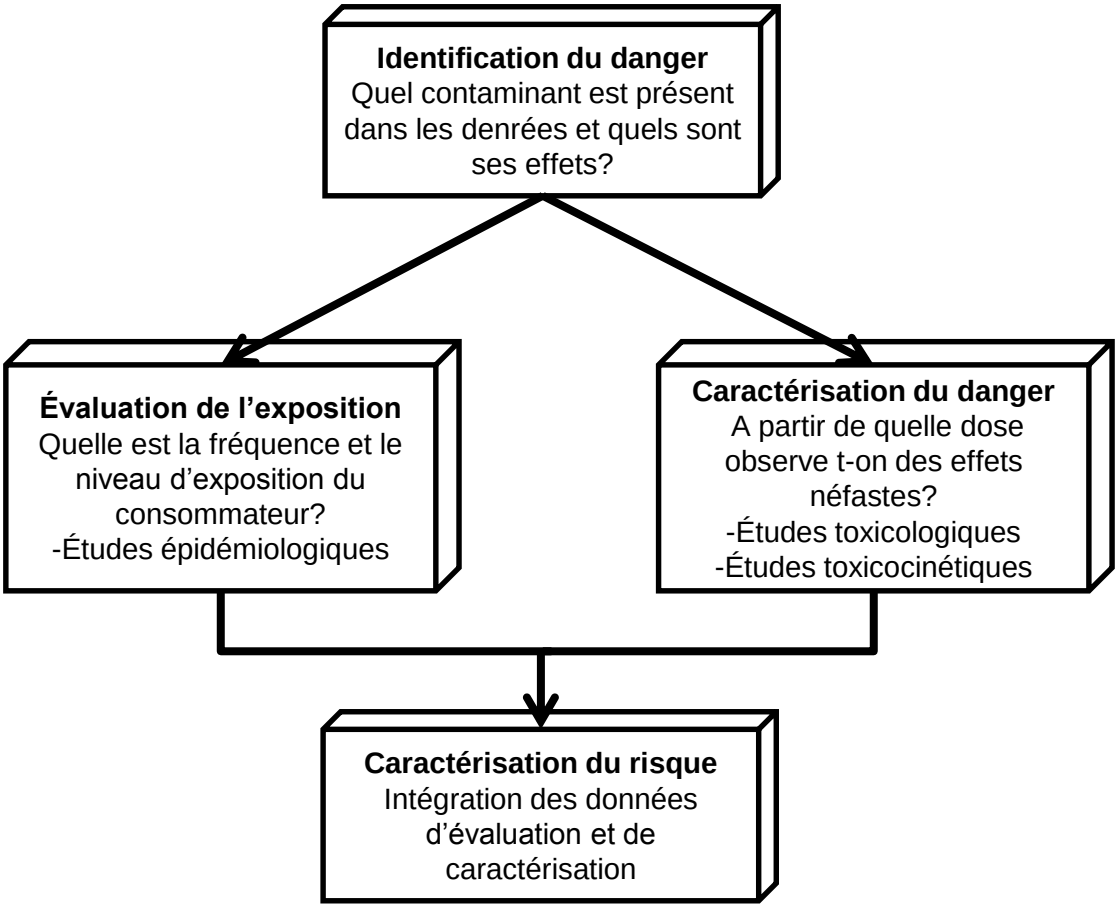


Figure 4 : Étapes du processus d'évaluation du risque, adapté de [8].

L'évaluation des risques alimentaires est un élément de l'analyse des risques, stratégie globale qui comprend également la gestion et la communication des risques [8]. Basée sur les connaissances scientifiques, l'évaluation des risques alimentaires fournit une estimation du risque ou une mesure de l'ampleur du risque sur la santé attribuable à des aliments potentiellement contaminés. Le processus d'évaluation du risque se fait en 4 étapes : l'identification du danger, la caractérisation du danger, l'évaluation de l'exposition et la caractérisation du risque (figure 4).

L'étape d'identification du danger consiste à identifier le contaminant et les effets toxiques pouvant être induits par la molécule. La caractérisation du danger permet d'identifier le devenir des contaminants dans l'organisme et les doses et/ou les concentrations induisant les effets toxiques et surtout les doses sans effet toxique. L'évaluation de l'exposition vise à définir les niveaux d'exposition du consommateur à des contaminants *via* l'alimentation. La caractérisation du risque compare les données de l'évaluation de l'exposition et les données de caractérisation du danger afin d'estimer le risque encouru par le consommateur.

En 2009, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) s'est saisie de l'évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans la chaîne alimentaire humaine et animale. Elle a procédé à une revue des connaissances sur les mycotoxines ayant un impact sur la santé humaine et/ou animale en se fondant sur des données bibliographiques et des évaluations récentes. Ce rapport (http://www.anses.fr/Documents/RCCP-Ra-Mycotoxines2009.pdf) présente les mycotoxines parmi lesquelles le DON.



Figure 5 : Comparaison entre du blé sain à gauche et du blé atteint de la fusariose à droite.

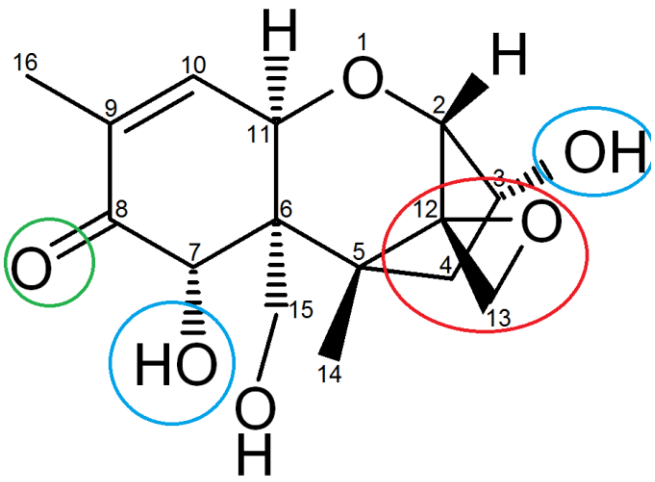


Figure 6 : Structure chimique générale du déoxynivalénol. Groupement spécifique aux trichothécènes de type B ; Groupement spécifique au DON ; Groupement principal responsable de la toxicité.

1 Identification

1.1 Origine et répartition

Le déoxynivalénol appartient à la famille des trichothécènes de type B. Il est issu du métabolisme secondaire de *Fusarium graminearum* et *culmorum,* deux agents pathogènes des céréales qui causent la fusariose du maïs et du blé [9-14] (figure 5). Le DON s'accumule dans les grains de céréales touchés par la fusariose principalement au cours de la culture au champ, et en particulier pendant la floraison lorsque l'humidité atmosphérique est élevée [15, 16]. De ce fait, les concentrations en DON dans les plantes peuvent varier considérablement en fonction de l'année et de la région.

Parmi l'ensemble des mycotoxines produites par *Fusarium*, le DON est un des contaminants les plus fréquemment retrouvé et le plus largement répandu à travers le monde dans les cultures céréalières (blé, orge, avoine, seigle, riz et maïs) [17-19] et les denrées alimentaires comme le montrent les figures 1 et 3 [1, 20-22]. Des différences peuvent être observées en ce qui concerne la prévalence du DON dans les différentes régions du monde. Le DON a été le plus souvent détecté en Asie du Nord (78% de positifs), en Amérique du Nord (68%), en Afrique (66%) et dans le nord de l'Europe (64%). La prévalence dans les aliments destinés à l'Homme est égale à celle observée pour les animaux mais à des concentrations généralement plus faibles [1].

1.2 Propriétés physico-chimiques et cibles moléculaires

La structure chimique du DON est présentée dans la figure 6. Il appartient au groupe des sesquiterpènoides qui possèdent un squelette tricyclique (trichothécane) formé par un cyclopentane, un cyclohexane, un cycle à six chainons oxygénés et 4 groupements méthyles. La fonction cétone en C_8 caractérise les trichothécènes de type B. Le DON se différencie des autres trichothécènes B par la présence de groupements hydroxyle (OH) en C_3 et en C_7 également associés à sa toxicité [23]. Il possède un groupement époxyde en C_{12-13}, principalement responsable de sa toxicité [24, 25]. Une des propriétés physico-chimiques les plus importantes du DON est sa capacité à résister à des températures élevées et des environnements acides ou basiques [26-30]. En effet, le DON est stable à des températures allant jusqu'à 170°C et un pH de 4 [30, 31].

Au niveau moléculaire, la toxicité du DON repose sur sa capacité à traverser les barrières biologiques (intestinale et hémato-encéphalique) et à affecter les fonctions et la viabilité des cellules. Les mécanismes moléculaires provoquant les effets indésirables du DON ne sont pas complètement connus. Néanmoins, il est acquis que le DON perturbe la structure et le fonctionnement des cellules eucaryotes. En effet, sa cible principale est la sous-unité 60S du ribosome induisant ainsi l'inhibition de la synthèse protéique [24, 32]. En se liant au ribosome, le DON active des *mitogen-activated protein kinases* impliquées dans les processus cellulaires de transduction du signal lié à la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Il va induire ainsi l'apoptose *via* un processus de réponse ribotoxique au stress [33, 34].

1.3 Effets sur la santé humaine

La consommation de produits contaminés par le déoxynivalénol serait à l'origine de plusieurs mycotoxicoses chez l'Homme provoquant les symptômes suivants : vomissements, diarrhées, douleurs abdominales, maux de tête, étourdissements et fièvre. Il est difficile d'associer une toxi-infection alimentaire à la présence de DON dans les denrées car ces symptômes sont les mêmes que pour des toxi-infections alimentaires d'origine bactérienne. Néanmoins, des manifestations aiguës impliquant *F. graminearum* ont été signalées en Chine [35], en Inde [36] et au Japon [37]. Le déoxynivalénol a également été étudié pour son implication possible dans des maladies chroniques telles que les cancers de l'œsophage, de l'estomac et du foie associées à des niveaux élevés de trichothécènes dans les céréales contaminées [38, 39] mais à ce jour, l'imprécision des outils d'évaluation de l'exposition limite l'établissement d'une relation de cause à effet. En 1993, le Centre international de Recherche sur le Cancer a placé le DON dans le groupe 3 "inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme".

1.4 Méthodes d'analyse

Le dosage du DON est essentiel aussi bien pour les producteurs, les autorités réglementaires que pour les chercheurs. Cela va permettre la surveillance et le contrôle de ce contaminant alimentaire, assurant ainsi la protection de la santé des consommateurs, la réduction des pertes économiques pour les producteurs et indirectement, l'amélioration des connaissances pour les scientifiques. Dans une revue bibliographique de Ran Ran et ses

collaborateurs (2013), les avantages et les inconvénients des méthodes d'analyses qualitatives et quantitatives actuellement disponibles pour le DON et ses dérivés ont été présentées [40]. La méthode choisie est fonction de la limite de quantification souhaitée et de la composition de la matrice. Alors que la purification de l'extrait n'est généralement pas nécessaire pour les dosages immunologiques, le dosage par méthodes physico-chimiques nécessite généralement des étapes d'extraction et de purification selon le type d'échantillon qui doit être analysé.

Le déoxynivalénol est relativement polaire comme d'autres trichothécènes de type B et est généralement extrait par technique solide-liquide au moyen de mélanges associant acétonitrile et eau. L'étape de purification des trichothécènes de type B s'effectue au moyen de colonnes. Les colonnes d'immuno-affinité présentent l'avantage de fournir les échantillons les plus propres.

Les tests ELISA sont principalement utilisés dans le dépistage du DON pour un nombre important d'échantillons alors que les méthodes instrumentales comme la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie liquide haute performance (CLHP) permettent la confirmation des échantillons révélés positifs lors du screening. Les méthodes d'analyse des mycotoxines telles que la CLHP ou la CPG sont très sélectives et spécifiques, mais requièrent un appareillage complexe et coûteux qui nécessite des opérateurs hautement spécialisés. La CLHP peut être couplée à un détecteur d'ultra-violets, de fluorescence ou une détection par spectrométrie de masse (SM) alors que l'analyse par CPG est effectuée en utilisant des techniques de détection de capture d'électrons, par SM ou par SM-SM en tandem. Comparées aux kits ELISA vendus dans le commerce, ces méthodes présentes des limites de détection et de quantification bien inférieures, une spécificité supérieure, ce qui en font des méthodes de choix, par exemple, pour les études de cinétique. Récemment, des techniques de chromatographie liquide à haute performance associées à la spectrométrie de masse en tandem ont été développées permettant en une seule analyse la multi-détection et la quantification de différentes mycotoxines dont le déoxynivalénol et ses métabolites au sein de différentes matrices [41-44].

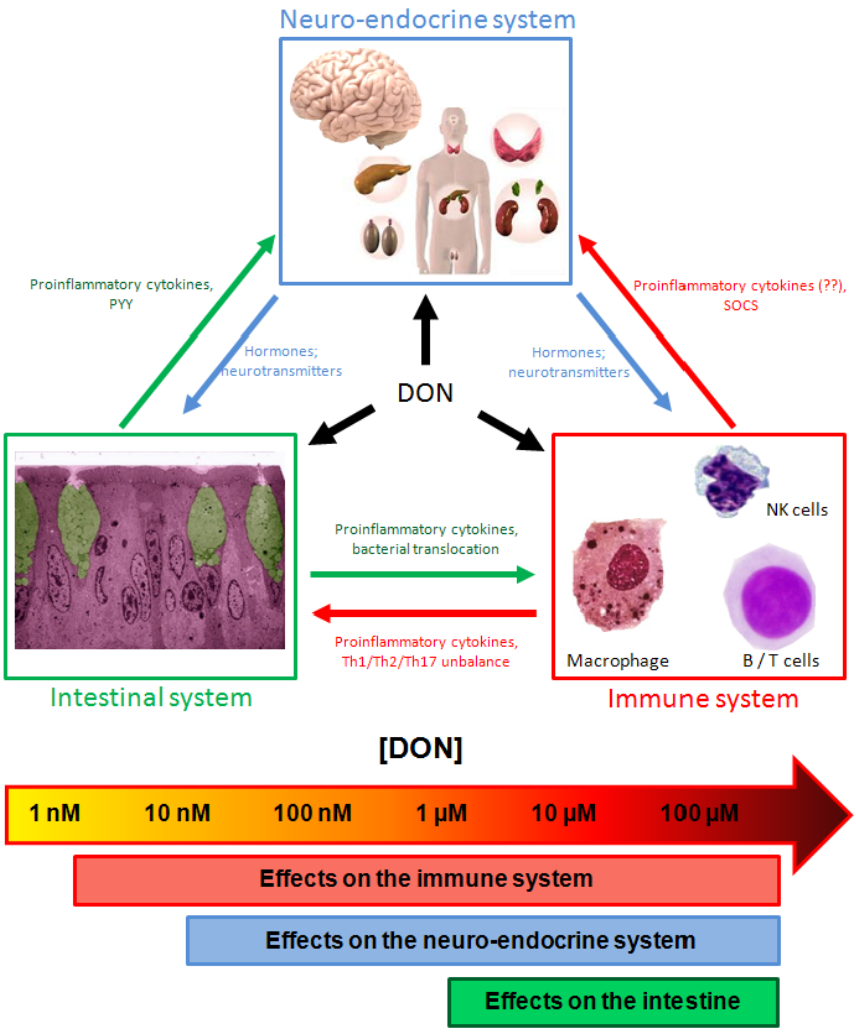


Figure 7 : Effets du DON sur les systèmes immunitaire, neuro-endocrinien et intestinal [45].
Les concentrations auxquelles les effets apparaissent, sont indiquées schématiquement au bas de la figure.

2 Caractérisation

2.1 Effets toxicologiques

Bien qu'il soit moins toxique que d'autres mycotoxines du groupe des trichothécènes comme la toxine T-2, le DON présente un risque majeur de sécurité alimentaire à cause de la fréquence de contamination élevée et de ses propriétés physico-chimiques. De nombreuses études sur la toxicité du DON chez l'animal ont permis de donner un aperçu des conséquences sanitaires de l'ingestion de cette mycotoxine aussi bien chez l'Homme [46] que chez l'animal [47]. La toxicité du DON dépend des quantités ingérées, des fréquences de consommation et des espèces animales considérées. L'ingestion de DON est associée à des altérations des systèmes immunitaire et neuro-endocrinien, de la muqueuse intestinale et de la croissance chez les animaux exposés comme le résument la figure 7 et le tableau 3 [47, 48].

Au niveau cellulaire, les cellules épithéliales intestinales (IEC) sont la première cible du DON dans le cas d'une exposition naturelle par ingestion d'aliments contaminés. Le DON altère la prolifération et la viabilité des cellules intestinales animales et humaines. Chez l'Homme, l'inhibition de la prolifération cellulaire est observée à des doses faibles (1 à 5 µM) et des effets cytotoxiques sont établis à des doses plus élevées (30 à 40 µM) [49, 50]. De même, des doses de DON plus élevées (10-50 µM) provoquent une toxicité cellulaire et l'apoptose des cellules intestinales chez le rat et le porc [51, 52]. Des expérimentations *in vitro* et *in vivo* ont également montré que le DON inhibe l'absorption intestinale des nutriments (glucose et acides aminés) par les cellules intestinales humaines [49] et animales [53, 54]. En plus d'affecter directement le transport de nutriments, le DON agit également sur la perméabilité de l'épithélium intestinal grâce à la modulation des complexes de jonctions serrées (10 à 50 µM) [55].

Une fois que la mycotoxine a traversé l'épithélium intestinal, le DON va cibler le système immunitaire. Il peut modifier de manière significative l'immunité humorale ainsi que l'immunité à médiation cellulaire dans une variété de cellules eucaryotes et chez les modèles animaux expérimentaux [56, 57]. Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que les cellules du système immunitaire telles que les macrophages, les lymphocytes B et T et les cellules tueuses naturelles (NK) sont très sensibles au DON [58, 59].

Tableau 3 : Effets physiologiques associés à une exposition au DON sur les systèmes intestinal, immunitaire et neuro-endocrinien en fonction de la dose, adapté de [45].

Organ/system affected	Effect	Doses Required (µM)
INTESTINE	Inhibition of the cell proliferation	1-5
	Increase in β-Defensin expression	2
	Decrease in nutrient absorption	10
	Decrease in mucin expression	10
	Increase in intestinal pathogenic Th17	10
	Increase in bacterial translocation	10
	Increase in IL-8 secretion	1-20
	Modification of the microbiota	20
	Increase in intestinal permeability	10-50
	Cytotoxicity	>30
	Decrease in IL-8 secretion	>30
	Increase in IgA secretion	500
IMMUNE SYSTEM	Increase in lymphocyte proliferation	0.001-0.03
	Activation of macrophages	0.001-0.1
	Increase in proinflammatory cytokines	0.1-1
	Decrease in lymphocyte proliferation	>0.1
	Inhibition of NK cells	>0.15
	Apoptosis of macrophages	>0.3
	Apoptosis of lymphocytes	10
ENDOCRINE SYSTEM	Steroid perturbations	0.3-3
	Increase in insulin secretion	1.44
	Decrease in IGF-1/IGFALS	1.8
	Increase in secretion of PYY	7
BRAIN	Feed refusal	0.001-0.075
	Activation of microglia	0.01-0.1
	Inhibition of glutamate uptake	0.05
	Cell death/Inhibition of microglia	>0.3
	Vomiting	1.2
	Direct neuroinflammation	1.5
	Cell death of astrocytes	31

In vitro, la sécrétion d'immunoglobulines par des lymphocytes de porc a été significativement inhibée par le DON de manière dose-dépendante [60]. Selon la dose, l'exposition à la toxine conduit soit à une immunostimulation entrainant des effets inflammatoires [61] ou alors à une immunosuppression [62] (figure 7 et tableau 3).

Des études ont également démontré que le DON est capable d'affecter le système nerveux et le système endocrinien (figure 7 et tableau 3).

Les symptômes de toxicité aiguë du DON comprennent des douleurs abdominales, une augmentation de la salivation, des malaises, de la diarrhée, des vomissements et de l'anorexie [47, 63]. À ce jour, de nombreuses espèces animales étudiées dans la littérature ont montré une sensibilité au DON et ont été classées du plus sensible au moins sensible selon l'ordre suivant : porcs > chats ≈ chiens > souris > rat > volaille ≈ ruminants [47]. Des différences dans les paramètres cinétiques chez les espèces animales pourraient en partie expliquer cette différence de sensibilité. Une exposition aiguë, par voie intrapéritonéale, à des doses supérieures à 46 mg/kg de poids corporel (pc) entraine une mortalité chez les souris de laboratoire [64] alors qu'une dose de 50 µg/kg pc par voie intraveineuse entraine des vomissements chez le porc [65-67].

L'effet le plus commun d'une exposition alimentaire prolongée des animaux au DON est l'anorexie. Lorsque des lésions tissulaires ont été détectées, le tractus gastro-intestinal et les tissus lymphoïdes ont été les cibles privilégiées.

D'un point de vue réglementaire, l'étude de toxicité chronique de 2 ans menée sur la souris par Iverson et ses collaborateurs (1995) [68], a permis d'établir des valeurs toxicologiques de référence pour le DON. L'effet toxique pertinent identifié dans cette étude était une diminution du gain de poids [68]. Le Comité d'experts FAO/WHO sur les additifs alimentaires (JECFA) et le comité scientifique de l'alimentation humaine (SCF) ont ainsi retenu pour le DON une dose sans effet toxique observable (No Observable Adverse Effect Level, NOAEL) de 100 µg/kg pc/j. Un facteur de sécurité de 100 (10 x10) a été appliqué à cette NOAEL pour obtenir la dose journalière tolérable (DJT) de DON équivalente à 1 µg/kg pc/j (JECFA, SCF 2001). Une teneur maximale de DON pour le grain et les denrées alimentaires à destination de l'alimentation humaine a été définie dans le règlement européen (CE) n°1126/2007 (tableau 4).

Tableau 4 : Limites maximales de DON pour le grain et les denrées alimentaires à destination de l'alimentation humaine (règlement (CE) n°1126/2007).

Céréales	Transformations	Limites maximales (µg/kg)
Blé tendre, orge	Brut	1250
	Farine	750
	Pain, pâtisseries, céréales de petit déjeuner	500
	Alimentation pour bébé	200
Blé dur, avoine	Brut	1750
	Farine	750
	Pain, pâtisseries, céréales de petit déjeuner	500
	Pâtes sèches	200
Maïs	Grain brut	1750
	Fractions mouture < 500 µm	1250
	Fractions mouture > 500 µm	750
	Produit à base de maïs	500
	Céréales de petit déjeuner. à base de maïs	500
	Alimentation pour bébé	200

Tableau 5 : Principales caractéristiques cinétiques du déoxynivalénol en fonction de l'espèce animale.

	Rongeurs	Ruminants	Volailles	Porcs
Espèce modèle [référence]	Rats [69], souris [70, 71]	Vaches [72], moutons [73, 74]	Poulets [75]	[76, 77]
Absorption	Rapide	Rapide et très faible 0.1 à 10% absorbé	Rapide et faible 19% absorbé	Rapide et moyenne 54% absorbé
Distribution	Rapide (rate, foie, poumons et reins) pas d'accumulation	-	Rapide pas d'accumulation	Rapide pas d'accumulation
Métabolisation	Moyenne En DOM et en DON-GlcA	Forte En DOM	Forte En DOM	Faible et rare En DOM
Excrétion	Urine et fèces	Urine et fèces Majoritairement sous forme métabolisée	Urine et fèces Majoritairement sous forme métabolisée	Urine et fèces
Élimination	Rapide 7.6 h	Rapide 4 h	-	Rapide Demi-vie 5.3 h

2.2 Cinétique du DON

Le tableau 5 résume les principales caractéristiques cinétiques du DON en fonction de l'espèce animale considérée.

2.2.1 Absorption

Après une administration orale, le DON est rapidement absorbé. Chez le porc, il se retrouve dans le sérum après seulement 15 minutes [76, 77]. Cette apparition rapide pourrait s'expliquer par une absorption qui débute probablement dans l'estomac ou dans la partie supérieure du duodénum [78, 79]. La concentration sanguine maximale est atteinte après 1.65 h pour une prise unique d'aliment contaminé [76] et jusqu'à 4.1 h après la consommation répétée d'aliment naturellement contaminé sur une période de 7 jours [78] ou 3.75 h après administration intragastrique de la toxine pure [77]. La biodisponibilité plasmatique du DON a été estimée à 54% chez le porc [76]. Chez le mouton, le DON est rapidement absorbé (t_{max} 4.0 à 5.3 h) mais sa biodisponibilité systémique est de seulement 7.5 à 10% [73, 74]. Chez la souris, après l'administration orale de DON, l'absorption maximale est atteinte au bout de 30 minutes [70]. Tout comme le mouton, la biodisponibilité du DON chez la volaille est relativement faible (19%) [75]. En ce qui concerne les ruminants, le taux d'absorption chez la vache est très faible, moins de 1% de la toxine d'origine est absorbée par voie systémique.

2.2.2 Distribution

Aucune étude n'a mis en évidence des phénomènes importants d'accumulation ou de rétention de DON au sein de l'organisme. Après une administration intraveineuse de DON à 1 mg/kg de poids corporel à des porcs, Prelusky et Trenholm (1991) ont observé après 3 h, du DON dans divers organes (intestin, pancréas, foie, poumons, glandes surrénales, rate, testicules, cerveau) et tissus (graisse et muscles) [80]. Chez la souris traitée par voie orale avec 25 mg de DON par kg de poids corporel, Yordanova et ses collaborateurs (2003) ont détecté la toxine dans le rein> le cœur> le plasma> le foie> le thymus> le rate> le cerveau [71].

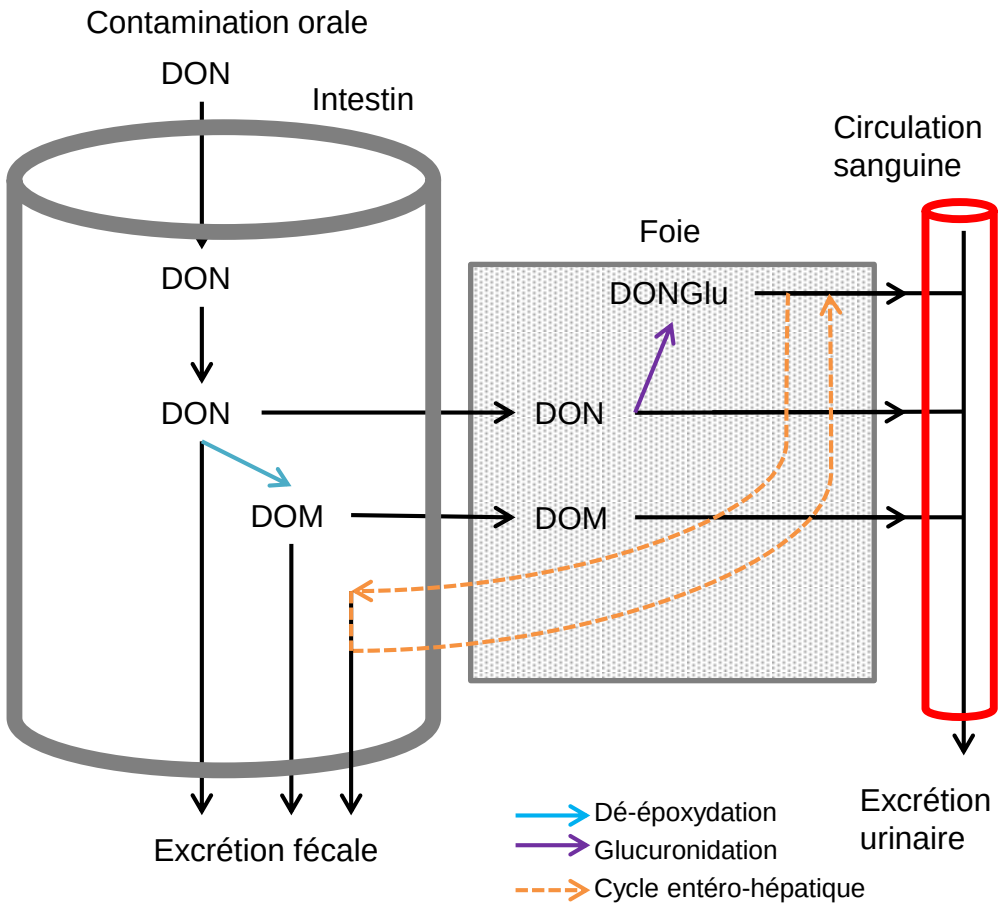


Figure 8 : Métabolisme et excrétion du déoxynivalénol dans l'organisme. DON : déoxynivalénol, DOM : dé-époxy déoxynivalénol, DONGlu : DON glucuronide.

2.2.3 Métabolisme

Le DON est métabolisé dans le tube digestif, sous l'action des micro-organismes intestinaux en dé-époxy déoxynivalénol (DOM) (figure 8). Cette forme est moins toxique que la forme parent, grâce à l'élimination du noyau époxyde [76, 81-85]. Il peut également être conjugué dans le foie *via* un métabolisme de phase II pour donner du DON glucuronide (DONGlu) (figure 8). Le composé glucuronide formé varie en fonction de l'espèce [86]. Ce conjugué est moins toxique que le DON car il n'interagit pas avec les sous unités 60S des ribosomes et est plus rapidement éliminé dans l'urine.

2.2.4 Élimination

Comme l'absorption et la distribution, l'élimination de la molécule de la circulation sanguine est rapide. La demi-vie d'élimination apparente est estimée à 7.6 h chez la souris [70], 5.3 h chez le porc [76] et à 4 h chez les ruminants [73, 74]. L'élimination est particulièrement rapide chez les volailles puisqu'elle est au moins 6 fois plus courte que chez les autres animaux (0.45h) [75]. L'excrétion du DON *via* les œufs est négligeable [87].

Le DON et ses métabolites sont principalement éliminés par l'urine et les fèces (figure 8). Chez le rat, la radioactivité excrétée dans l'urine et les fèces représentent respectivement pour 25 et 64% de la dose administrée dans les 96 heures après une administration orale de 10 mg/kg pc de DON marqué au ^{14}C [88]. Chez la vache, environ 20% de la dose de DON ingéré était éliminé dans l'urine et les matières fécales sous forme de DOM (96%) et de DON (4%) [72]. Le DON est également détecté dans le lait de vaches ayant reçu 920 mg de DON par voie orale mais à un niveau extrêmement faible [89]. Bien qu'il n'existe aucune étude de cinétique chez l'Homme, il a été mis en évidence l'excrétion urinaire du DON chez des fermiers français [90] et des habitants du Royaume-Uni [83].

Tableau 6 : Estimation de l'exposition totale au DON et contribution des produits sélectionnés chez l'Homme (évaluations du JECFA de 2001 et de 2010).

Région	Estimation de l'exposition au DON	Contribution à l'exposition au DON (%)						
2001	**(µg/kg pc/j)**	**Blé**	**Maïs**	**Riz**	**Orge**	**Avoine**	**Seigle**	**Bière**
Afrique	0.78	24	40	33	3	< 1	0	--
Europe	1.4	79	2	2	16	< 1	< 1	--
Extrême-Orient	1.6	47	6	44	3	0	< 1	--
Amérique Latine	1.2	64	10	18	7	< 1	0	--
Moyen-Orient	2.4	88	6	5	1	0	0	--
2010								
Afrique du Nord	0.19	100	--	--	--	--	--	--
Afrique du Sud	4.37	20	80	--	--	--	--	--
Europe du Nord	0.81	85	2	0	5	2	1	4
Europe du Sud	14.52	37	63	--	--	--	--	0
Europe de l'Est	0.54	56	20	--	24	--	0	--
Europe de l'Ouest	1.61	75	19	0	1	0	2	2
Asie de l'Est	1.32	87	13	0	0	0	0	--
Amérique du Sud	0.65	89	--	11	--	--	--	--
Extrême Orient, Asie, Pacifique	0.25	40	40	--	16	--	--	0
Canada, Etats-Unis, Australie	11.04	83	--	--	10	--	--	8

Tableau 7 : Expositions moyennes au DON de la population française (Études d'Alimentation Totale (EAT) 1 et 2).

Etudes	Expositions moyennes au DON (µg/kg pc/j)		% d'individus pouvant dépasser la dose journalière tolérable*	
	Adultes (15 ans et +)	Enfants (3-14 ans)	Adultes (15 ans et +)	Enfants (3-14 ans)
EAT 1 2000-2004	0.28	0.45	0.4	4
EAT 2 2012	0.37 – 0.41	0.54 – 0.61	0.5 – 0.7	5 – 10

*dose journalière tolérable : 1 µg/kg pc/j

3 Exposition

3.1 Monde

L'exposition alimentaire au DON a été évaluée par le Comité d'experts FAO/WHO sur les additifs alimentaires (JECFA) en 2010. L'évaluation a utilisé les données d'occurrence du DON pour le blé, le maïs, le riz, l'orge, l'avoine, le seigle et la bière à disposition entre 2001 et 2010 résumées dans le tableau 6. Les résultats de 2010 indiquent que deux aliments de base, pour une grande partie de la population mondiale, sont des contributeurs majeurs à l'exposition au DON : le blé de 20 à 89% de l'exposition totale suivi par le maïs 2 à 80% en fonction de la région. Le sud de l'Europe et le Nord de l'Amérique sont exposées à des concentrations en DON entre 3 et 70 fois supérieures aux autres régions.

3.2 France

À travers les études de l'alimentation totale (EAT) réalisées sur le territoire français, l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (Anses) a caractérisé l'exposition de la population générale à certaines mycotoxines d'intérêt incluant le DON. Le détail des expositions moyennes au DON et à ses dérivés acétylés (3-A-DON et 15-A-DON) est présenté dans le tome 1 du rapport de l'EAT 2 de 2012 (www.anses.fr) et dans le tableau 7. Pour résumer, lors de l'EAT 2, l'exposition moyenne totale au DON et à ses dérivés acétylés s'élève à 0.4 µg/kg pc/j chez les adultes et à 0.6 µg/kg pc/j chez les enfants (tableau 7). L'exposition au DON seul est légèrement plus élevée que les estimations faites lors de l'EAT 1. Chez les adultes comme chez les enfants, le pain et les produits de panification sèche apparaissent comme les contributeurs majoritaires à l'exposition au DON (60% et 40%, respectivement) (figure 9). En 2012, dans la population française, 0.5 à 0.7% des adultes et 5 à 10% des enfants sont exposés à des concentrations en DON dépassant la dose journalière tolérable (DJT = 1 µg/kg pc/j DON + dérivés acétylés) (tableau 7). Ces résultats sur l'exposition de la population française aux mycotoxines montrent une augmentation des dépassements de la DJT par rapport à la précédente évaluation de 2000-2004 (EAT 1). Les conclusions de l'étude indiquent que le DON présente un risque ne pouvant être écarté pour la population.

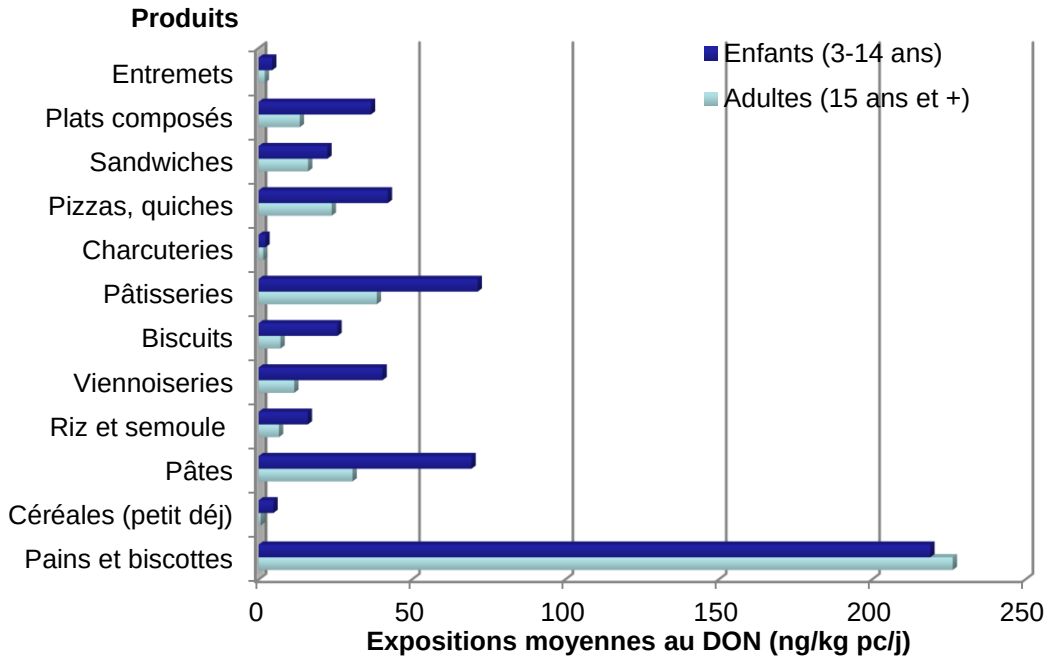


Figure 9 : Exposition moyenne au déoxynivalénol de la population française (adultes et enfants) en fonction des denrées alimentaires, adapté de [91].

4 Prévention

Afin de réduire l'exposition aux mycotoxines, des mesures préventives qui concernent la gestion « pré-récolte » (bonnes pratiques agricoles), la gestion de la récolte et « post-récolte » (bonnes pratiques de fabrication, décontamination) sont mises en œuvre à partir de recommandations européennes du « Code d'Usages en Matière de Prévention et Réduction de la Contamination des Céréales par les Mycotoxines, y compris les appendices sur l'Ochratoxine A, la Zéaralénone, les Fumonisines et les Trichothécènes » [92].

4.1 Gestion « pré-récolte »

Les différentes stratégies afin d'empêcher la croissance des champignons producteurs de DON avant la récolte comprennent l'utilisation de fongicides et/ou de cultivars résistants à *Fusarium*, la rotation des cultures et l'élimination des débris de la récolte précédente par enfouissement ou enlèvement [93].

Cependant, l'utilisation des fongicides sur des matières premières destinées à l'alimentation n'est pas très efficace et présente un risque sanitaire pour le consommateur [94-97]. De plus, des niveaux élevés de DON peuvent être produits, même pendant les derniers stades de développement du grain, au cours de laquelle les fongicides sont évités [98]. Des mesures supplémentaires sont donc nécessaires pour réduire le risque d'ingestion de mycotoxines.

Le développement et l'utilisation de cultivars résistants sont considérés comme une stratégie importante pour éviter l'infection par *Fusarium*. Les études ont permis d'identifier un certain nombre de gènes chez le blé impliqués dans cette résistance de certaines variétés [99, 100].

L'utilisation de micro-organismes pour le contrôle de la croissance de *Fusarium* et la production de DON est une stratégie de lutte qui montre des résultats prometteurs. En effet, plusieurs souches bactériennes en condition de serre, ont été capables de réduire le développement de *Fusarium* et la quantité de DON produit [101-103].

Basés principalement sur la susceptibilité du cultivar, la taille de l'inoculum fongique et les conditions climatiques, des modèles informatiques capables de prédire l'occurrence de fusarioses et/ou les niveaux de contamination en DON ont été développés dans un certain nombre de pays comme l'Argentine, le Canada, l'Italie, les Pays-Bas, la Suisse ou encore

les États-Unis [104-109]. Ces prédictions peuvent permettre aux pays d'adapter leur calendrier de récolte afin de limiter le risque d'exposition au DON.

4.2 Gestion « post-récolte »

Les stratégies de gestion post-récolte viseront à limiter la croissance de *Fusarium* et à minimiser l'entrée du DON dans la chaîne alimentaire humaine et animale mais à l'heure actuelle elles ne sont utilisées que dans la filière animale [110]. Plusieurs méthodes physiques ont été utilisées en particulier l'enlèvement des grains endommagés qui repose sur une différence de taille et de poids.

Parmi les méthodes physico-chimiques, des procédures de lavage des grains de blé et de maïs avec de l'eau ou une solution aqueuse de carbonate de sodium peuvent réduire les concentrations de DON. Néanmoins, le coût de séchage du grain limite l'utilisation de cette approche [111].

L'utilisation de plusieurs produits chimiques, y compris le bisulfate de sodium, l'hypochlorite, des minéraux argileux naturels et modifiés, l'ozone, et l'ammoniac pour décontaminer les grains contaminés en DON ont été examinées par le JECFA en 2001. Malgré le grand potentiel de ces traitements, leur utilisation à grande échelle est limitée car certains de ces agents chimiques réduisent la valeur nutritionnelle des aliments tandis que d'autres laissent des résidus toxiques [112].

L'addition de micro-organismes a également été proposée comme une stratégie post-récolte car certaines bactéries du microbiote ruminal et intestinal ont le potentiel de détoxifier le DON [111].

5 Conclusion

Le risque toxicologique associé à une exposition au déoxynivalénol est bien caractérisé. En revanche concernant la cinétique, aucune donnée n'est disponible pour l'Homme et il y a une insuffisance au niveau des résultats retrouvés dans la littérature pour les modèles animaux utilisés. En effet, la biodisponibilité, paramètre définissant la fraction de la dose administrée qui atteint la circulation générale à une vitesse donnée, est rarement calculée alors que la principale voie de contamination est alimentaire et que le DON est absorbé par voie orale. De plus, certains paramètres cinétiques ont été calculés sur la base de concentrations inférieures à la limite de quantification (LOQ) et parfois à la limite de détection (LOD) de la méthode analytique [76]. La LOQ étant la plus petite quantité d'analyte qui peut être quantifiée avec une exactitude définie, par conséquent, les concentrations inférieures à cette LOQ, fournissent des résultats approximatifs et peu fiables. Il apparait clairement que les résultats engendrés ne permettront pas de donner des interprétations correctes. Une seconde remarque est l'utilisation de calculs inappropriés dans la détermination des paramètres cinétiques (moyenne) conduisant à des mauvaises estimations et donc à des paramètres erronés [76]. L'ensemble de ces observations entraine la non validité des paramètres calculés, et par conséquent, nous amène à nous interroger sur la fiabilité des données de cinétique et sur la pertinence de l'interprétation des résultats. Cependant, la détection de DON dans les fèces et son absorption qui semble incomplète impliquent des contacts probables avec le microbiote intestinal. De plus, la prévention du DON *via* des additifs microbiens met en évidence des interactions entre la mycotoxine et les micro-organismes.

Interactions Déoxynivalénol/Bactéries

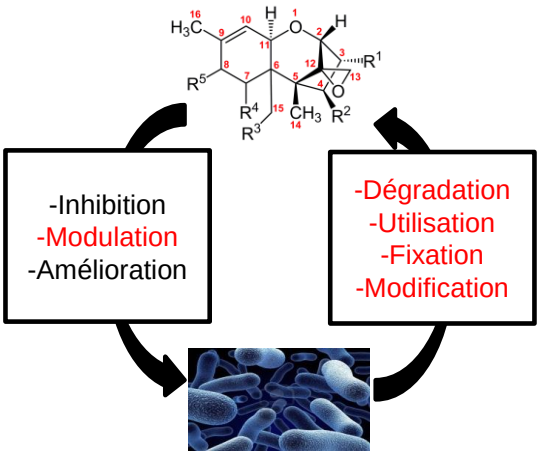


Figure 10 : Interactions possibles entre un xénobiotique (trichothécènes) et les micro-organismes. En rouge, les interactions démontrées dans la littérature pour le DON.

Tableau 8 : Études montrant des interactions entre les bactéries et le DON.

Bactéries	Origine	Interaction	Réf
Eubacterium BBSH 797	Rumen de vache	Dégradation	[113]
Culture microbienne C133	Contenu digestif de poisson chat	Dégradation	[114]
Bacillus subtilis ZZ ; *Bacillus licheniformis* DY	Probiotique	Dégradation	[115]
Agrobacterium-Rhizobium E3-39	Sol	Dégradation	[116]
Microbiote intestinal	Homme	Dégradation	[81]
Clostridiales, Anaerofilum, Collinsella, Bacillus	Contenu intestinal du poulet	Dégradation	[117]
Culture mixte de Serratia + Clostridium + Citrobacter, Enterococcus + Stenotrophomonas + Streptomyces	Sol de champs de maïs contaminé en DON	Dégradation	[118]
Nocardioides, *Devosia*	Sol	Dégradation	[119]
Lactobacillus sp	Blé	Adsorption	[120]
Lactobacillus sp, *Propionibacterium sp*	Probiotique	Adsorption	[121]
Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Propionibacterium, Streptococcus	Probiotique	Adsorption	[122]
Nocardioides WSN05-2	Sol	Utilisation	[123]

Réf : référence bibliographique.

À l'image des xénobiotiques, plusieurs types d'interactions sont possibles entre les mycotoxines et les micro-organismes, celles-ci sont schématisés sur la figure 10. Certaines ont été mises en évidence entre le DON et les bactéries, comme le détaille le tableau 8.

1 Action des bactéries sur le DON

1.1 Dégradation du DON

Plusieurs études *in vitro* ont démontré la transformation du déoxynivalénol par des bactéries provenant d'environnements variés de sols ou encore de contenus intestinaux d'animaux [124, 125]. Le DON peut être transformé par dé-époxydation (réduction du noyau époxyde) en DOM (figure 11) par des écosystèmes microbiens complexes ou des bactéries isolées issus de contenus caecaux de différentes espèces animales, y compris la vache [126], le rat [127], le mouton [128], le poulet [117, 129] et le porc [130]. Cette voie de détoxification par le microbiote fécal est lente (48 à 72h) et plus ou moins efficace selon l'espèce animale (80% à 100% de conversion) [131, 132].

1.1.1 Écosystèmes microbiens

Des recherches ont été menées afin d'évaluer la capacité de cultures microbiennes mixtes à transformer le DON [124]. Des inocula microbiens provenant de rumen de vache, de sol contaminé en DON et des contenus du gros intestin de poulets et de porcs ont été incubés avec du DON pendant 96 h. Tous les inocula ont été capable de métaboliser le DON (poulet (100%) > sol (50%) > vache (35%)) sauf le contenu intestinal porcin. Pour autant, les micro-organismes responsables de cette biodégradation n'ont pu être ni isolés, ni identifiés. Ces résultats confirment également les données obtenues par d'autres études dans lesquelles il a été également observé que les micro-organismes du rumen transformaient 89% du DON en DOM en 24 heures [126]. Comme les ruminants, les volailles possèdent une microflore intestinale capable de convertir efficacement le DON en DOM [129]. Concernant le porc, dans une étude sur la biotransformation du déoxynivalénol par la flore intestinale, des suspensions de contenu intestinal (duodénum, jéjunum, caecum, côlon, rectum) ont été incubées avec du DON. Dans une étude *in vitro*, il a été démontré que la flore porcine était capable de dégrader le DON et qu'il s'agissait principalement de la flore issue du côlon [130].

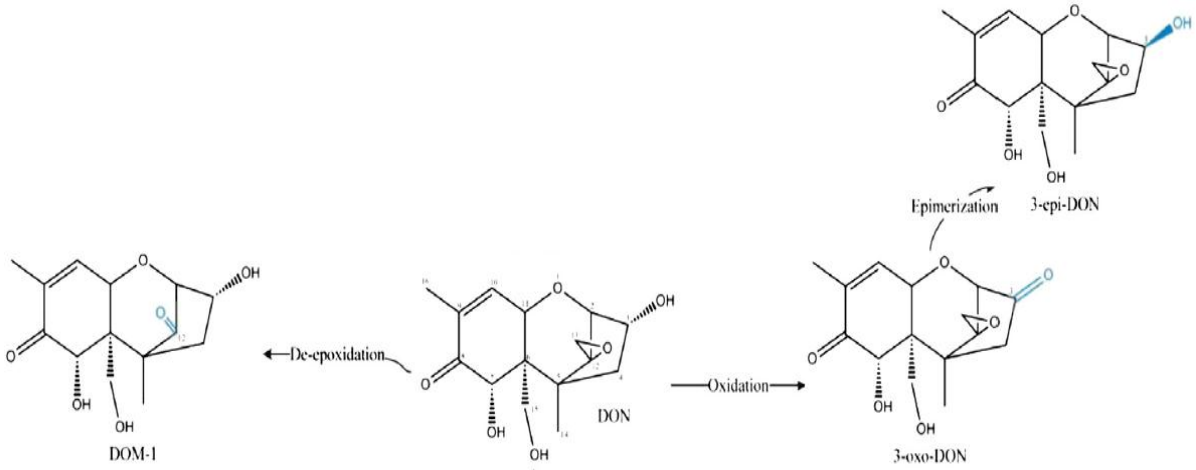


Figure 11 : Métabolisme du déoxynivalénol par les bactéries, adapté de [40]. DON : déoxynivalénol, DOM-1 : Dé-époxy déoxynivalénol, 3-oxo-DON : 3-oxo-déoxynivalénol, 3-epi-DON : 3-épi-déoxynivalénol.

Les avis sont contrastés quand les études se sont portées sur le microbiote intestinal humain. En effet, il n'a pas été mis en évidence d'activité de métabolisation du DON alors qu'une transformation de DON en DOM dans un échantillon fécal humain a été observée [81, 133]. Le taux de conversion du DON en DOM-1 variait selon les échantillons prélevés allant de 36 à 107% de la dose de DON convertie en DOM après 24 h d'incubation [81]. Des investigations supplémentaires semblent nécessaires pour établir un lien et identifier les voies métaboliques mises en jeu lors du processus de dégradation du DON par les bactéries du tractus digestif chez l'Homme.

1.1.2 Bactérie isolée

Dans la continuité des études globales sur les écosystèmes capables de transformer le DON, des études plus fines ont permis d'isoler et de caractériser des espèces ou des genres bactériens capable de dégrader la molécule. Une étude a été menée afin d'isoler des bactéries de l'intestin de poulet capable de transformer le DON [117]. Les bactéries isolées lors de cette étude sont issues de quatre groupes bactériens : *Clostridiales*, *Anaerofilum*, *Collinsella*, et *Bacillus* (tableau 6). En outre, tous les isolats transformaient le DON en DOM de la même manière par dé-époxydation (figure 11). À partir d'un échantillon de sol, il a été isolé, une souche bactérienne E3-39 appartenant au groupe *Agrobacterium-Rhizobium* capable de métaboliser le DON en 3-oxo-déoxynivalénol (figure 11) [116]. Une autre souche également isolée du sol, *Nocardioides sp*. WSN05-2, utilise le DON comme seule source de carbone et d'énergie pour produire un nouveau métabolite intermédiaire, le 3-épi-déoxynivalénol (figure 11) [123]. Ces souches font partie des rares exemples de bactéries capables de transformer le DON en aérobiose. Inoculée dans des grains de blé traités avec du DON, la souche WSN05-2 a permis de réduire d'environ 90% la quantité de DON en 7 jours [123]. Une étude récente a permis également d'identifier 9 souches appartenant au genre *Nocardioides* et 4 du genre *Devosia* capables de dégrader le DON en condition *in vitro* [119].

1.2 Adsorption du DON

D'autres bactéries sont capables d'adsorber le DON. En effet, certaines souches de bactéries lactiques sont capables, *in vitro*, de réduire la teneur en DON par l'adsorption de la mycotoxine sur leur paroi cellulaire [120, 121]. Il a été également observé que certaines

souches de *Lactobacillus* et *Propionibacterium* peuvent faire diminuer de 18 à 93% la teneur en DON en milieu liquide [121]. Cette diminution pourrait être liée à un phénomène d'adsorption mettant en jeu des interactions non covalentes faibles entre la bactérie et le DON, interactions réversibles après des étapes de lavage [121]. Dans une étude récente, il a été montré que toutes les souches étudiées présentaient un potentiel pour l'élimination du DON en milieu liquide, avec des taux de réduction allant de 16% pour *Lactabacillus plantarum* FB VII à 71% pour *L. plantarum* Lyofast BG112 [120]. La teneur en DON dans le milieu de culture diminue aussi bien en présence de bactéries viables que de bactéries inactivées par pasteurisation ou stérilisation. Bien que les mécanismes d'adsorption ne soient pas encore entièrement élucidés, le peptidoglycane et les polysaccharides composant la paroi cellulaire bactérienne semblent également être impliqués dans la capture des mycotoxines [120].

1.3 Application

Le potentiel de détoxification des bactéries isolées a été confirmé dans des études *in vivo* [111, 134]. Un additif composé d'une souche d'*Eubacterium sp*. isolée du rumen bovin s'est révélé efficace dans la lutte contre la toxicité du DON chez les poulets de chair [135] et chez les porcs [136] nourris avec des régimes alimentaires contaminés en DON. Dans le but d'utiliser des méthodes biologiques de décontamination pour des denrées contaminées en DON, l'industrie a donc élaboré des probiotiques utilisés comme additif alimentaire [137].

2 Action du DON sur les bactéries

2.1 Action sur les fonctions métaboliques

Très peu d'études se sont intéressées à l'effet que pourrait avoir le DON sur les bactéries. Pourtant, certains auteurs ont mis en évidence qu'en présence de DON, certaines voies métaboliques propres aux bactéries pouvaient être modifiées. Dans un modèle *in vitro* de rumen, les productions de gaz, d'azote ammoniacal et d'acides gras à chaîne courte (acétate, propionate) ont été réduites après ajout de DON, démontrant que la mycotoxine était capable de perturber le processus de fermentation, processus majeur réalisé par les bactéries du rumen [138].

En revanche, la présence de DON dans le milieu de culture n'affecte pas le taux de croissance de *Butyrivibrio fibrisolvens* une des bactéries prédominantes du rumen [139]. Une autre étude concernant la sensibilité de bactéries et de levures au déoxynivalénol a été réalisée en utilisant un test de diffusion sur disque. La croissance bactérienne des espèces testées n'était pas modifiée lorsque les disques contenaient 500 µg de DON. En revanche, *Kluyveromyces marxianus*, une espèce de levure, était le seul micro-organisme inhibé par le DON [140].

2.2 Action sur l'équilibre du microbiote

Le DON est également un facteur mis en cause dans la modification du microbiote intestinal de porcs nourris avec de l'aliment contaminé [141]. L'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'effet d'une alimentation naturellement contaminée par le DON sur la microflore intestinale du porc. La dynamique des communautés bactériennes a été évaluée par comptage sur boîtes et par polymorphisme de conformation des simples brins (SSCP). La consommation d'aliments contaminés en DON à 2.8 mg/kg d'aliment pendant quatre semaines a eu un effet modéré sur les bactéries intestinales cultivables. À la fin de l'essai, la flore mésophile aérobie était plus élevée chez les porcs recevant le régime contaminé que dans le groupe témoin. Les analyses des profils SSCP ont également mis en évidence des changements dans la microflore intestinale chez les animaux exposés, suggérant un impact de cette toxine sur la dynamique des communautés bactériennes intestinales. Néanmoins les espèces impliquées dans cette modification n'ont pas été identifiées.

3 Conclusion

L'action des bactéries sur le DON a été plus largement étudiée que l'impact du DON sur celles-ci. En effet, l'utilisation de micro-organismes pour la décontamination du DON dans les denrées alimentaires est une stratégie de lutte biologique particulièrement attractive pour l'industrie agro-alimentaire. Ces études visant à caractériser des souches bactériennes qui pourraient réduire les effets toxicologiques des mycotoxines, ont permis d'identifier une large gamme de micro-organismes (bactéries, moisissures et levures) ayant une action sur le DON, en particulier des bactéries provenant du sol ou de contenus caecaux. À l'inverse, le DON agit aussi bien sur les fonctions métaboliques microbiennes que sur la composition de l'écosystème bactérien intestinal.

Toutes ces observations démontrent qu'il existe des interactions entre le DON et les bactéries et que l'écologie du microbiote intestinal pourrait être perturbée lors d'une contamination alimentaire par le DON.

Le Microbiote Intestinal Humain

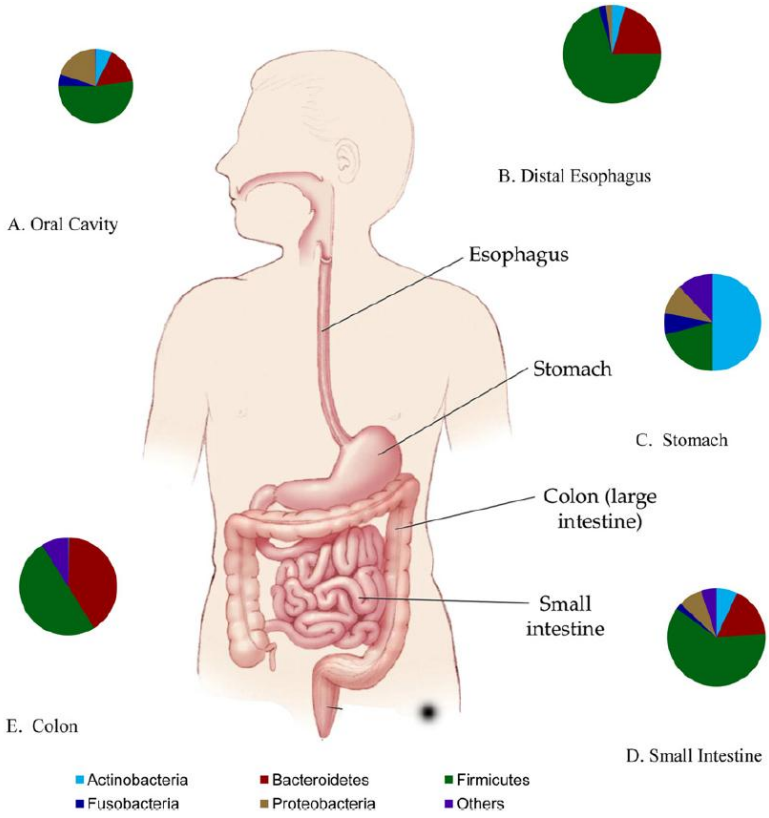


Figure 12 : Diversité des *phyla* dominants le long du tractus gastro intestinal [142].

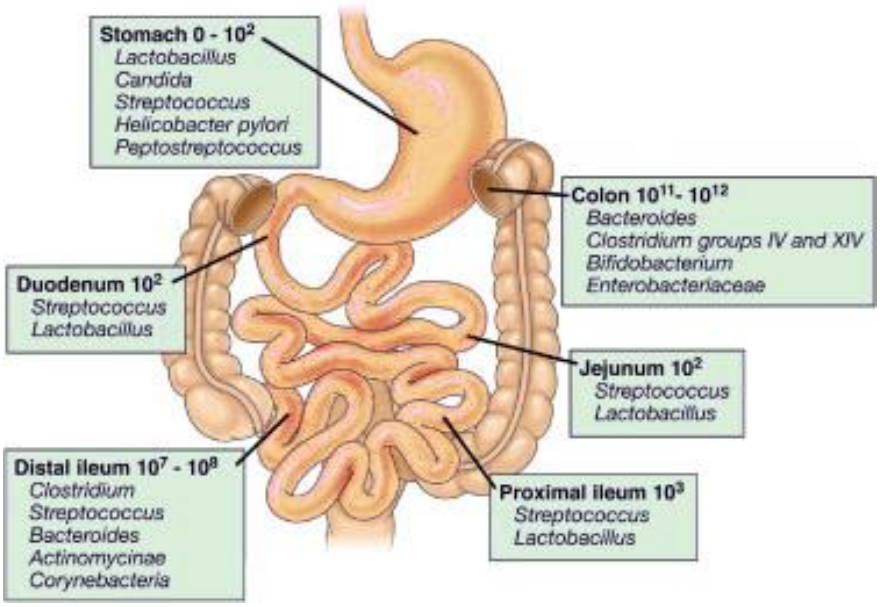


Figure 13 : Distribution et abondance des bactéries dans le tractus digestif, adapté de [143].

1 Écologie

À l'heure actuelle, le microbiote est considéré comme un organe, jouant un rôle important dans l'équilibre de la santé.

1.1 Composition

Le microbiote intestinal humain (MIH) se compose de communautés microbiennes qui colonisent tout le tube digestif (figure 12). Il est composé d'environ 10^{11} à 10^{12} micro-organismes par gramme de contenu, ce qui est 10 fois plus élevé que le nombre total de cellules humaines [144]. La diversité et la densité du microbiote augmente de l'estomac en allant vers le côlon (figure 13) [145]. Le gros intestin est le site principal de la colonisation microbienne dans le corps humain et les estimations suggèrent qu'il abrite plus de 10^{14} micro-organismes, la plupart appartenant au domaine des bactéries [146]. La flore fécale a été la plus étudiée et contient 10^{9} à 10^{11} UFC/g de fèces. La flore dominante (>10^{9} UFC/g) est composée essentiellement de bactéries anaérobies strictes comprenant des bacilles à Gram négatif (*Bacteroides*) et à Gram positif (*Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*) ainsi que des coques à Gram positif (*Peptostreptococcus* et *Ruminococcus*). Ces observations ont été corroborées par des études moléculaires basées sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. Celles-ci ont révélé que plus de 90% de tous les phylotypes appartiennent aux *Bacteroidetes* et aux *Firmicutes*, et que les *Proteobacteria*, les *Actinobacteria*, les *Fusobacteria* et les *Verrucomicrobia* sont les autres divisions présentes [147-150]. En ce qui concerne les grandes familles, le groupe *Bacteroides* représente 37 ± 16% de l'ARNr total, les groupes *Clostridium coccoides* et *Clostridium leptum* respectivement 14 ± 6% et 16 ± 7% et les groupes *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Enterobacteriaceae* moins de 2% [151]. Au niveau des espèces ou des souches, les variations sont plus importantes, de sorte que chaque individu héberge une communauté bactérienne unique [147].

En plus des bactéries, des micro-organismes eucaryotes sont également présents dans l'intestin et jouent différents rôles bénéfiques ou néfastes. Certaines espèces peuvent être commensales ou mutualistes, tandis que d'autres peuvent être opportunistes ou parasitaires [152]. Leur diversité dans l'intestin humain est faible et leur rôle fonctionnel chez l'Homme demeure inexploré [153-155].

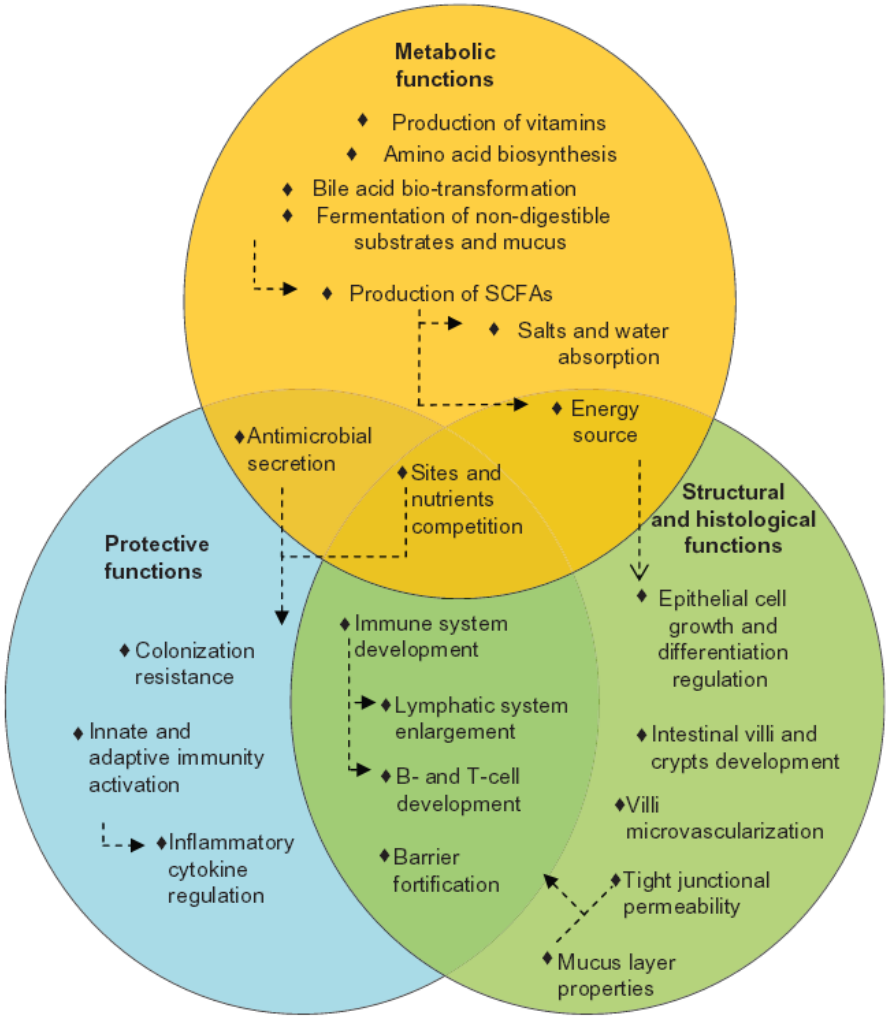


Figure 14 : Principales fonctions bénéfiques du microbiote intestinal humain [156]. Les flèches représentent les relations causales.

À partir de 2008, les premières études sur les virus ont suggéré que la plupart des virus à ADN trouvés dans l'intestin étaient des phages et que la plupart des virus à ARN étaient des virus de plantes [157]. Néanmoins, une étude de métagénomique récente, montre que 80% des génomes viraux identifiés ne correspondent à aucun virus connu dans les bases de données, ce qui suggère que la diversité au sein du virome humain commence à peine à être caractérisée [157-159].

1.2 Fonctions

Grâce à sa grande diversité microbienne, le microbiote intestinal humain va remplir des fonctions diverses (figure 14) [160].

1.2.1 Fonctions métaboliques essentielles

Les activités métaboliques effectuées par le microbiote intestinal sont diverses et essentielles pour le métabolisme de l'hôte (figure 14). Le microbiote intestinal possède les voies métaboliques assurant la fermentation de substrats non digestibles. Grâce cette fermentation, la croissance bactérienne est stimulée, mais aussi la production d'acides gras à chaîne courte qui interviennent dans le développement cellulaire [161]. Le microbiote optimise également la disponibilité des nutriments et des minéraux essentiels ingérés en modulant leur absorption par l'épithélium intestinal [162]. Les bactéries contribuent par l'intermédiaire de leurs enzymes qui sont absents chez les humains au catabolisme de fibres alimentaires et de glucides complexes [163]. Par exemple, plusieurs espèces du genre *Bacteroides* produisent des glycosides hydrolases qui digèrent les glucides en nutriments utilisables par l'hôte [164]. La production de vitamines et la biosynthèse d'acides aminés sont deux autres fonctions trophiques dans lesquelles est impliqué le microbiote intestinal. La biotransformation des acides biliaires effectuée par les enzymes microbiennes, a des répercussions sur les métabolismes du cholestérol et du glucose [165].

1.2.2 Intervention dans le développement cellulaire intestinal

Le microbiote intestinal est impliqué dans le développement de l'épithélium intestinal. En effet, les principaux acides gras à chaîne courte produits lors de la fermentation bactérienne (acétate, butyrate, propionate) ont un effet trophique sur l'épithélium intestinal. Par exemple, le butyrate va réguler la croissance et la différenciation cellulaire de la muqueuse intestinale [166]. Les bactéries intestinales façonnent également le développement des villosités microvasculaires [167].

1.2.3 Microbiote intestinal et le système immunitaire

Le microbiote joue un rôle actif dans le développement et l'homéostasie du système immunitaire [168, 169]. En effet, les signaux des bactéries intestinales sont importants pour le développement et la maturation des lymphocytes T régulateurs et T auxiliaires. Par exemple, les bactéries spécifiques telles que *Bacteroides fragilis* [170] et *Bifidobacterium infantis* [171] promeuvent la maturation des lymphocytes T régulateurs et fortifient ainsi la barrière intestinale. Plusieurs espèces du genre *Bacteroides* sont impliquées dans la maturation du système immunitaire intestinal de l'hôte [172]. Les lactobacilles activent différemment les cellules dendritiques, les incitant à produire différentes gammes de cytokines inflammatoires, et jouent ainsi un rôle important dans la modulation de la balance Th1, Th2 et Th3 [173]. Les acides gras à chaîne courte, comme le butyrate, peuvent aussi exercer un effet immunomodulateur.

1.2.4 Rôle dans la protection de l'hôte

Les micro-organismes commensaux peuvent prévenir la colonisation par un pathogène par compétition pour les sites de fixation et l'utilisation de nutriments, et aussi à travers la production et la sécrétion de peptides antimicrobiens comme les bactériocines [174]. L'utilisation des nutriments par le microbiote endogène joue un rôle dans la répression des espèces pathogènes résidentes comme *Clostridium difficile* à de faibles niveaux dans l'intestin [175]. Les activités métaboliques intrinsèques du microbiote endogène permettent de créer les conditions à l'intérieur de l'intestin qui peuvent inhiber la croissance et l'expression des gènes de virulence de pathogènes envahisseurs. Les acides gras à chaîne courte (AGCC) peuvent agir comme inhibiteurs de l'expression des gènes de virulence. Par

exemple, l'exposition de *Salmonella enterica* au butyrate régule négativement l'expression des gènes de virulence du système de sécrétion de type III et diminue ainsi sa capacité à envahir ou à induire l'apoptose des cellules hôtes [176]. En plus des effets directs inhibiteurs, la production d'AGCC et d'autres acides organiques tels que le lactate provoquent également des réductions localisées de pH à des niveaux inférieurs à l'optimum de croissance de pathogènes entériques tels que *Salmonella spp*. et *Escherichia coli* O157, inhibant ainsi leur développement *in vivo* [177]. De nombreuses bactériocines produites par les bactéries commensales de l'intestin ont une activité bactéricide contre les agents pathogènes comme *Salmonella spp.* [178] et *C. difficile* [179]. La quantité d'O_2 est réduite par l'activité métabolique des bactéries intestinales conduisant ainsi à des conditions anaérobies le long du tractus digestif. *Shigella flexneri*, pathogène responsable de la dysenterie, en condition anaérobie dans le tractus gastro-intestinal, est incapable d'exprimer les gènes de virulence qui contrôlent l'activité de son système de sécrétion de type III [180].

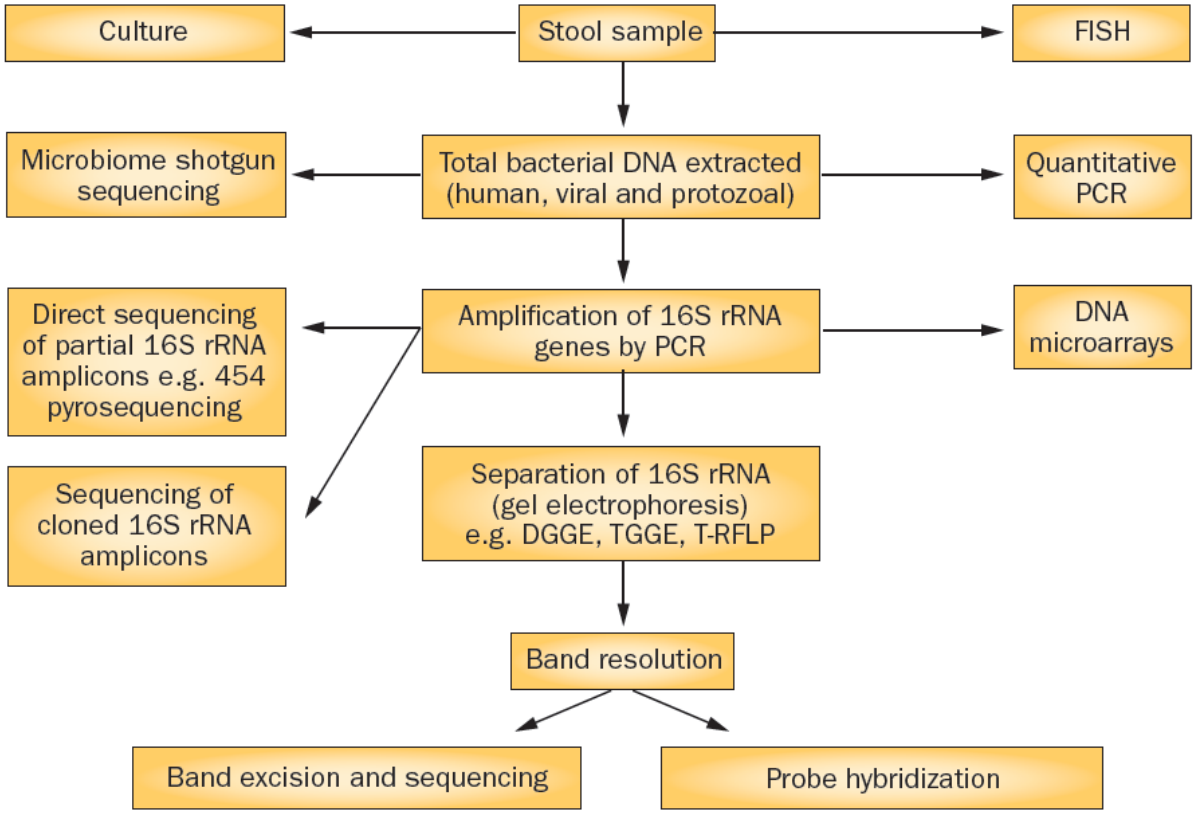


Figure 15 : Techniques utilisées pour étudier le microbiote intestinal [181].

2 Caractérisation de l'écosystème intestinal bactérien

Le microbiote intestinal est un écosystème complexe qui exerce une influence considérable sur l'état physiologique, immunologique et nutritionnel de son hôte. Une connaissance approfondie du consortium microbien intestinal par la caractérisation de cet écosystème permet de mieux comprendre les relations existantes entre le microbiote intestinal et son hôte. Un certain nombre d'approches utilisées afin d'analyser le microbiote intestinal sont résumées dans la figure 15. Ces techniques d'analyses peuvent être qualitatives et/ou quantitatives, leur objectif ainsi que leurs avantages et inconvénients sont présentés dans le tableau 9.

2.1 Méthodes culturales

Jusque dans les années 1990, la culture bactérienne était la seule technique disponible pour caractériser la composition du microbiote intestinal. Bien que les méthodes culturales soient peu chères, elles donnent une vue relativement limitée de la diversité du microbiote intestinal puisqu'on estime à moins de 30% les membres du microbiote intestinal pouvant être cultivés sur milieux sélectifs. En effet, les conditions permettant la croissance de tous les organismes composant le microbiote n'ont pas encore été mises au point. Même si les techniques de culture deviennent de plus en plus sophistiquées, certaines bactéries du microbiote intestinal resteront difficilement isolables et cultivables. En effet, certains micro-organismes dépendent de l'activité métabolique d'autres organismes pour leur croissance, limitant ainsi l'utilité et l'intérêt du développement de nouveaux milieux de culture.

La biologie moléculaire a offert la possibilité de découvrir des groupes bactériens sans isolement au préalable sur des milieux de culture spécifiques.

2.2 Techniques d'empreintes moléculaires

Les techniques d'empreintes génétiques (polymorphisme de conformation des simples brins (SSCP), électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE/TGGE), polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (T-RFLP)) sont des outils d'analyse communautaire qui permettent d'obtenir une vision globale des profils des populations microbiennes par comparaison de polymorphisme d'amplicons d'ADN issus de

Tableau 9 : Résumé des différentes approches d'étude du microbiote intestinal.

Techniques	Objectif	Avantages	Inconvénients	Résultat
Méthodes culturales	dénombrement, identification taxonomique	-prix	-micro-organismes uniquement cultivables, -manipulation fastidieuse pour un grand nombre d'échantillons -sélectivité	Quantitatif
T-RFLP	profil de la communauté identification taxonomique possible	-haut débit -sensibilité importante	-optimisation nécessaire, digestion incomplète par les enzymes -manipulation fastidieuse pour un grand nombre d'échantillons -biais d'extraction et d'amplification d'ADN -sélectivité, même longueur de fragment pour plusieurs espèces	Qualitatif
DGGE	profil de la communauté, identification taxonomique possible	-résolutif	-manipulation fastidieuse pour un grand nombre d'échantillons -variabilité gel à gel -sensibilité limitée pour des communautés très complexes -biais d'extraction et d'amplification d'ADN	Qualitatif
FISH	identification taxonomique	-utilisation *in situ*	-pas de profils des communautés trop complexes -design des sondes -sélectivité, réactions croisées -sensibilité dépendante du nombre de ribosomes et de l'accessibilité	Qualitatif Quantitatif (couplage à la cytométrie de flux)
Biopuces	identification taxonomique profil de la communauté	-puces commercialisées -analyses simultanées de plusieurs échantillons	-réactions croisées	Qualitatif Quantitatif
qPCR	identification taxonomique dénombrement	-haut débit -sensibilité, limite de quantification la plus basse -sélectivité -rapidité -prix	-biais d'extraction et d'amplification d'ADN -design des amorces et des sondes	Quantitatif
Séquençage haut débit	identification taxonomique profil de la communauté	-haut débit -sensibilité	-prix -biais d'extraction d'ADN -outils d'analyse sophistiqués	Qualitatif Quantitatif
Métagénomique	identification taxonomique profil de la communauté et de ses fonctions potentielles	-haut débit -sensible	-prix -biais d'extraction d'ADN -outils d'analyse sophistiqués	Qualitatif

l'échantillon. Ces techniques sont basées sur des divergences de séquence de l'ARN ribosomique (petite sous-unité 16S ARNr). Les profils de bandes d'ADN générés permettent de rendre compte de la diversité des gènes ribosomiques donc des bactéries présentes dans l'échantillon étudié. Ces techniques sont couplées à une étape préalable d'amplification. Ces techniques sont de moins en moins utilisées au profit de techniques plus précises et moins contraignantes (PCR en temps réel, puces à ADN, séquençage haut débit).

2.3 Hybridation

Les techniques d'hybridation sont basées sur la complémentarité de séquences cibles de l'ADN bactérien et de sondes oligonucléotidiques spécifiques. Ces techniques permettent d'identifier des groupes taxonomiques spécifiques et/ou des espèces bactériennes. La principale utilisation de l'hybridation est l'identification phylogénétique.

2.3.1 Hybridation fluorescente *in situ* (FISH)

La détection de séquences nucléotidiques s'effectue indirectement, par hybridation des sondes sur l'ADN cible au préalable dénaturé. La révélation du complexe sonde-ADN cible consiste à faire reconnaître les sondes par des anticorps flanqués de molécules fluorescentes. L'observation des séquences hybridées s'effectue à l'aide d'un microscope à épifluorescence, qui éclaire l'échantillon avec une lumière de longueur d'onde spécifique de la molécule fluorescence fixée à l'anticorps. Un avantage de cette technique est la possibilité de l'utiliser directement sur l'échantillon de fèces. De plus, en combinaison avec la cytométrie en flux, elle devient une méthode quantitative à haut débit pour l'analyse du microbiote intestinal [182, 183]. En recherche clinique, la technique de FISH est principalement utilisée pour comparer le microbiote intestinal de patients sains et de patients malades par exemple. Cette technique permet également de distinguer l'abondance relative d'un nombre restreint d'espèces ou de familles. Cette technique est rapide et quantitative mais avec une limite de quantification plus élevée que la qPCR.

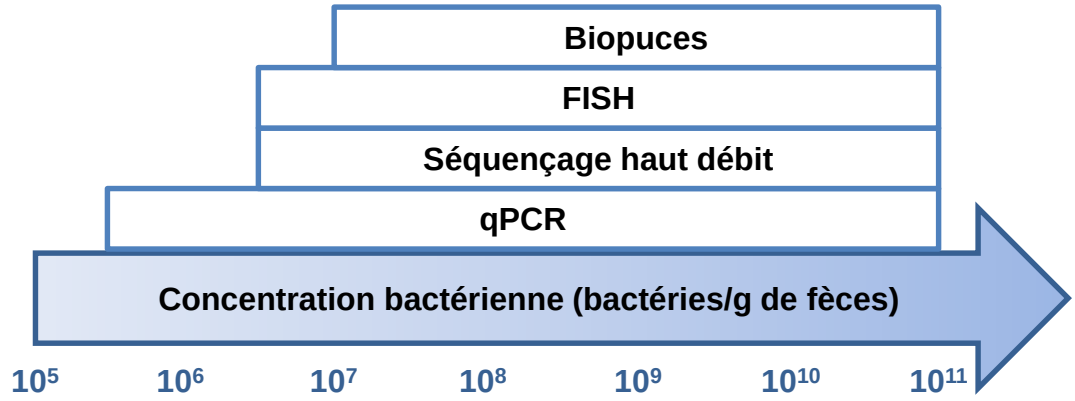


Figure 16 : Intervalle de quantification de différentes techniques moléculaires.

2.3.2 Puces phylogénétiques (biopuces, puces à ADN)

La puce phylogénétique est constituée de fragments d'ADN immobilisés (spots) sur un support solide selon une disposition ordonnée. En parallèle, les échantillons d'ADN à analyser sont marqués avec un fluorochrome. Après hybridation de l'échantillon biologique marqué sur la puce, chaque spot excité par un laser est analysé individuellement par un scanner à très haute résolution. Une analyse bio-informatique du signal va permettre d'estimer l'intensité de la fluorescence qui est proportionnelle à l'intensité d'expression des gènes. Les puces phylogénétiques offrent la possibilité d'évaluer la structure, l'identité phylogénétique et l'activité métabolique d'un certain nombre de bactéries ou communautés bactériennes cibles appartenant au microbiote intestinal [184-186]. Certaines de ces puces à ADN sont disponibles dans le commerce, comme par exemple, la HITChip™ (Agilent Technologies Inc) et la PhyloChip ™ (Affymetrix) [187-190]. Elles présentent une stratégie intéressante pour l'étude à haut débit des communautés microbiennes complexes. Cette technique est rapide, qualitative et/ou quantitative et plusieurs échantillons peuvent être testés simultanément.

2.4 PCR en temps réel (qPCR)

La qPCR peut être utilisée seule ou en combinaison avec d'autres techniques. Les études sur le microbiote intestinal utilisant uniquement la qPCR ont permis de montrer des changements dans la composition du microbiote liés à l'âge du patient, à l'utilisation d'antibiotiques ou encore à un état physiopathologique [191-193]. Certaines techniques moléculaires utilisées pour caractériser le microbiote intestinal (empreintes moléculaires §2.2, puces à ADN §2.3.2) sont qualitatives mais utilisées en combinaison avec la qPCR, ces techniques permettent de fournir des informations plus détaillées sur la diversité et l'abondance du microbiote intestinal [194-196]. Par exemple, en utilisant la DGGE et la qPCR, il a été montré que l'abondance et la diversité bactériennes étaient plus faibles chez les personnes âgées que chez les jeunes [196].

Le principal atout de la qPCR est qu'elle est la meilleure méthode permettant le dénombrement des bactéries du microbiote intestinal et qu'il est possible d'y inclure la discrimination phylogénétique en concevant des amorces pour cibler des espèces ou des communautés particulières [197, 198]. Elle possède également la limite de quantification la plus basse (figure 16).

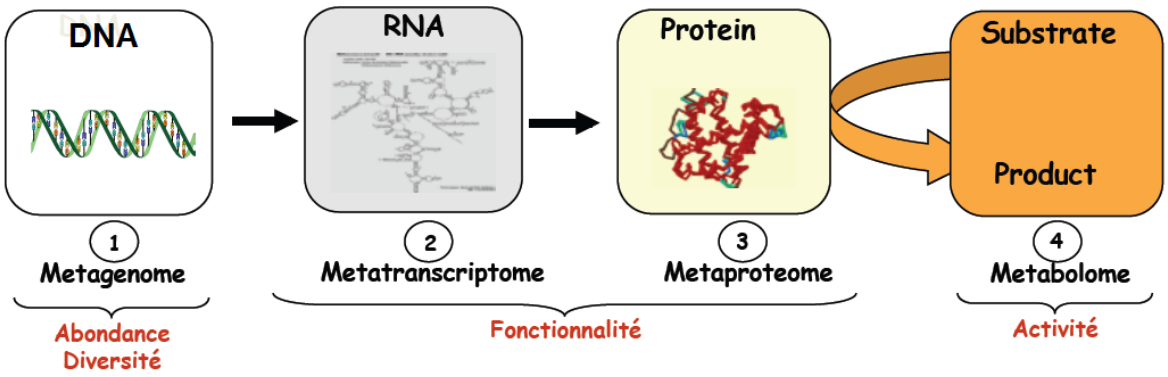


Figure 17 : Cibles et approches « Méta-Omiques » associées pour l'étude des communautés microbiennes [199].

2.5 Pyroséquençage

Le pyroséquençage consiste en un séquençage partiel (100 à 400 paires de bases) à haut débit d'amplicons de l'ARNr 16S fixés sur des supports solides. Les principales technologies disponibles dans le commerce comprennent les systèmes : *454 Pyrosequencing*® de *Roche Diagnostics*, *Illumina*® d'*Illumina* et *SOLiD*™ de *Life Technologies*. L'avantage de cette technique est la capacité à recueillir rapidement un nombre important de données (haut débit). En ajoutant des codes-barres spécifiques lors de l'amplification de l'ARNr 16S, plusieurs échantillons différents peuvent être séquencés en même temps. L'identification phylogénétique, la détection et/ou l'identification de bactéries inconnues sont d'autres atouts de cette technique. Le pyroséquençage a permis de mettre en évidence la modification de la composition du microbiote intestinal après la pose d'un anneau gastrique chez une personne en surpoids [200]. Néanmoins le coût encore élevé du pyroséquençage pour les études du microbiote reste une contrainte majeure à son utilisation.

2.6 Métagénomique

Le développement le plus récent dans l'analyse du microbiote intestinal est la métagénomique. C'est une approche plus globale qui permet d'avoir l'inventaire génétique complet de l'échantillon de fèces contrairement au pyroséquençage qui étudie uniquement la diversité génétique à partir d'un gène ciblé. Cette approche métagénomique a l'avantage non seulement de donner la caractérisation phylogénétique de la communauté microbienne, mais peut aussi informer des fonctions biologiques présentes dans la communauté. Elle évite d'une part, la nécessité d'isoler les bactéries par des étapes de culture et d'autre part, la connaissance à priori des séquences ADN des membres de la communauté bactérienne [148].

En complément de la métagénomique, il existe d'autres approches en « omique » qui étudient les métabolites (métabolomique), les protéines (métaprotéomique) et l'ARN (métatranscriptomique) (figure 17). Lors de l'extraction d'ADN, il n'est pas possible de savoir si celui-ci provient de cellules intactes, viables ou non, ce n'est donc pas un témoin idéal pour évaluer les fonctions actives exercées par la communauté à un moment précis dans le temps. Pour obtenir des informations sur les fonctions actives, il est nécessaire d'examiner le profil d'expression des gènes ou encore des protéines produites. En assemblant ces

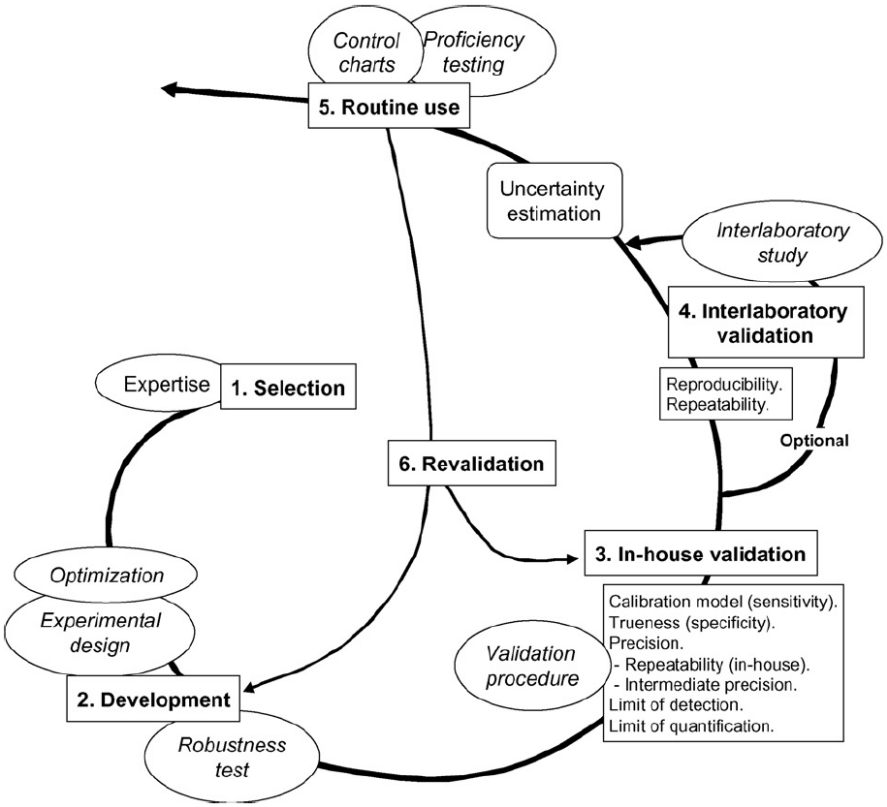


Figure 18 : Cycle de vie d'une méthode analytique en physico chimie [201]. Les différentes étapes du cycle apparaissent en caractères gras ; les procédures ou les critères utilisés ou calculés sont dans les rectangles ; les outils ou les techniques utilisés sont en italique dans les ellipses.

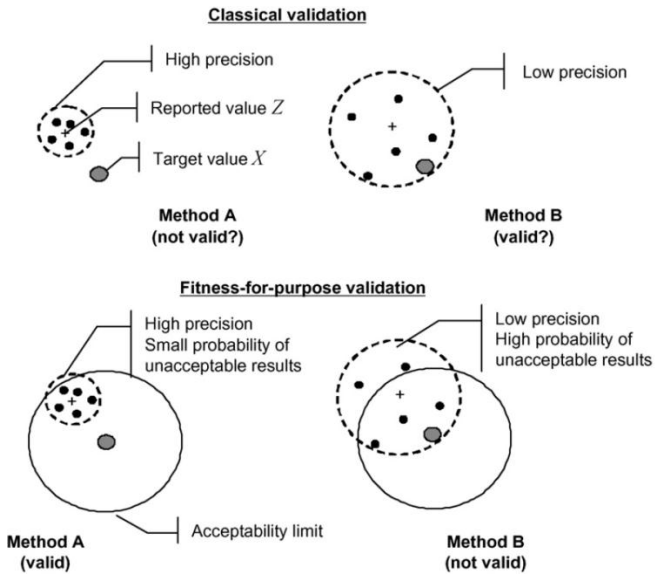


Figure 19 : Comparaison de procédures de validation [201]. Le cercle en pointillés représente la fidélité de la méthode, et le cercle continu, la limite d'acceptabilité. La *Classical validation* correspond à ce que l'on retrouve en biologie moléculaire et correspond plutôt à de la caractérisation plutôt qu'à de la validation réelle de la méthode. La *Fitness-for-purpose validation* est particulièrement utilisée en physico chimie.

différentes approches, il sera possible de mieux appréhender le fonctionnement du microbiote intestinal humain.

Pour conclure, le plus souvent, une combinaison de ces méthodes est utilisée pour l'analyse des communautés microbiennes.

2.7 Validation des méthodes

Ces méthodes d'analyses moléculaires qualitatives ou quantitatives doivent être fiabilisées afin que les résultats fournis soient exploitables. Il est alors nécessaire de réaliser une étude de validation pour démontrer que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée. La validation se définit comme la «confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies » [202]. Les principaux paramètres de performances qui doivent être examinés afin de garantir la fiabilité de la méthode développée et donc des résultats sont [203, 204] :

- la fonction de réponse (courbe d'étalonnage) : relation existante entre la réponse (signal) et la concentration de la substance à examiner dans l'échantillon
- la justesse : étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence
- la fidélité (répétabilité et précision intermédiaire) : étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène
- l'exactitude : étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence (combinaison de la justesse et de la fidélité)
- la linéarité : capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon.
- les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ)
- l'intervalle de dosage

Utilisée en routine en physico-chimie dans le développement de méthode analytique (figure 18) [205], la démarche de validation est mal exploitée en biologie moléculaire (figure 19). En effet, peu de publications ont pleinement démontré l'efficacité des méthodes à travers des études de validation [206]. En outre, la plupart des études ont évalué les performances des méthodes de quantification en utilisant des échantillons enrichis avec des bactéries non-représentatives des groupes bactériens ciblés, à une seule concentration, qui

ne reflète pas les concentrations retrouvées ou attendues dans l'échantillon analysé [207, 208].

Sous accréditation NF/EN ISO 17025 [202], le laboratoire de Fougères se doit d'utiliser des techniques de dosage complètement validées. De plus, le système de management de la qualité a été étendu aux activités de recherche et appliqué notamment à l'ensemble des travaux de thèse (annexes 1 et 2). Par conséquent, une attention toute particulière sera donnée à la validation de la méthode moléculaire utilisée.

3 Déséquilibre du microbiote intestinal

3.1 Causes

Le microbiote est, en général, assez résistant aux changements environnementaux, comme l'illustre la remarquable stabilité de son profil d'espèces sur des échelles de temps s'étendant de quelques jours à plusieurs mois, voire des années [209-211]. Néanmoins certains facteurs semblent pouvoir influencer sa composition comme l'alimentation, le stress ou encore la prise de médicaments notamment des antibiotiques.

3.1.1 L'alimentation

Les changements alimentaires ont des effets significatifs sur la composition et la diversité du microbiote. Par exemple, une alimentation riche en graisses animales favorise la dominance des *Bacteroides*, alors qu'un régime alimentaire riche en glucides est associée à une majorité bactérienne de la famille des *Prevotella* [212]. Les prébiotiques sont également connus pour moduler la composition du microbiote intestinal de l'Homme. En pratique, il s'agit d'un ingrédient qui permet des changements spécifiques dans la composition du microbiote intestinal qui confèrent des avantages sur la santé. Une augmentation significative des niveaux de bifidobactéries fécales a été signalée suite à l'ingestion de 15 g/j d'inuline ou d'oligofructose chez des volontaires [213].

3.1.2 Les médicaments

Les médicaments connus pour perturber la composition du microbiote sont les antibiotiques. Les antibiotiques ont un effet conséquent sur la flore, et leur utilisation peut entrainer notamment des désordres intestinaux. Plusieurs études ont mis en évidence des modifications du microbiote après un traitement avec des antibiotiques. Par exemple, un traitement de 5 jours à la ciprofloxacine a modifié l'abondance d'environ un tiers de l'écosystème bactérien intestinal chez les patients [214]. Une diminution significative des bifidobactéries et autres genres bactériens et à l'inverse, la prolifération d'*Enterococcus faecalis,* chez des patients hospitalisés et traités avec un cocktail d'antibiotiques a été montré [191]. Dans une revue bibliographique, les effets à long terme d'un traitement

Tableau 10 : Exemples de maladies associées à une dysbiose du MIH [215].

Implicated Microbiota[a]	Changes in Microbiota Presence/Function	References[b]
Allergies		
Lactobacillus spp. ↓	early colonization with *Lactobacillus* associated w/decreased allergies	[216]
Bifidobacterium adolescentis ↓	early colonization with more diverse microbiota might prevent allergies	[168]
Clostridium difficile ↓		
Helicobacter pylori ↓	*H. pylori* tolerance mediated by Tregs that suppress asthma	[217]
Celiac's disease		
Bacteroides vulgatus ↑ Escherichia coli ↓ Clostridium coccoides ↓	higher diversity (Shannon-Wiener index) in Celiac's disease patients versus controls	[218]
Gastric Cancer		
H. pylori ↑	important element in carcinogenic pathway for developing gastric adenocarcinomas	[219]
Austim		
Bacteroidetes ↑ *Proteobacteria* ↑ *Actinobacteria* ↓ *Firmicutes* ↓	increased bacterial diversity in feces of autistic children compared to controls	[220]
Obesity		
Bacteroidetes ↓ *Lactobacillus* ↑	significant changes in gut microbiota are associated with increasing obesity	[221, 222]
Firmicutes/*Bacteroidetes* ratio ↓		[221]
Methanobrevibacter smithii ↓		[223]
Anorexia		
Methanobrevibacter smithii ↑	*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, and *Lactobacillus* similar to lean patients, though *M. smithii* significantly increased	[222, 224]
IBD-Crohn's Disease		
Bacteroides ovatus ↑ *Bacteroides vulgatus* ↑ *Bacteroides uniformis* ↓	less diversity in patients with Crohn's disease compared to healthy patients	[225]
IBD (General)		
Bacteroidetes ↓ *Lachnospiraceae* ↓ *Actinobacteria* ↑ *Proteobacteria* ↑ *Clostridium leptum* ↓ *Clostridium coccoides* ↓ *Faecalibacterium prasnitzii* ↓ *Firmicutes*/*Bacteroidetes* ratio ↓ *Bifidobacteria* ↓	IBD associated with overall community dysbiosis rather than single causal bacterial species	[226, 227]
Type 2 Diabetes		
Firmicutes ↓ *Clostridia* ↓ *Bacteroides-Prevotella* ↑ versus *Clostridia coccoides-Eubacterium rectale* ↓ *Betaproteobacteria* ↑ *Bacteroidetes*/*Firmicutes* ratio ↑	shifts in gut microbiota associated with increases in plasma glucose concentrations	[228]

[a]Changes relative to healthy subjects. Increase: ↑. Decrease: ↓. [b]References are exemplary rather than exhaustive and focus on studies that compare healthy versus diseased individuals.

antibiotique ont été décrits, et la conclusion globale est la diminution de la diversité bactérienne [229]. La chimiothérapie s'est également révélée capable de modifier le microbiote intestinal notamment en réduisant le nombre total de bactéries [230].

3.1.3 Le stress

Un stress psychologique peut altérer l'intégrité de la flore endogène pendant plusieurs jours [231]. Des personnes en réponse à la colère ou à des situations effrayantes présentent une augmentation de 20 à 30% de la proportion de *Bacteroides thetaiotaomicron* dans leurs selles. Lorsque ces situations sont résolues, la concentration de ces micro-organismes dans les fèces revient à des niveaux normaux [232]. Le stress peut induire une diminution significative des bactéries bénéfiques comme les lactobacilles et les bifidobactéries et une augmentation des *E. coli*. Ces changements sont causés par la production en situation de stress de la noradrénaline qui favorise la croissance des micro-organismes gram-négatifs ou par des changements dans la motilité de l'intestin et de ses sécrétions [233].

3.2 Conséquences

Le microbiote intestinal développe un certain nombre de fonctions non négligeables dans le maintien de la santé de l'hôte qui peuvent être compromises lorsque la microflore est considérablement modifiée. Certaines maladies comme l'obésité, le diabète de type 1 et de type 2, le syndrome du côlon irritable, le cancer du côlon, les maladies inflammatoires de l'intestin sont associées à des déséquilibres de certains groupes bactériens du microbiote intestinal (tableau 10) [234-240]. Ces changements sont des symptômes de la maladie ou alors des facteurs contributifs au développement de la maladie.

3.2.1 Obésité

L'obésité est un problème de santé majeur étroitement liée au microbiote [241]. Ley et ses collaborateurs (2005) ont montré, chez des rats obèses, que le rapport entre les phylums dominants dans l'intestin est modifié de façon significative avec la réduction du nombre de *Bacteroidetes* et à l'inverse, une augmentation du nombre de

Firmicutes [221]. La même observation a été observée chez les individus sous régime amaigrissant [241].

3.2.2 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

Les MICI regroupent la maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique. Elles se caractérisent toutes les deux par une inflammation de la paroi d'une partie du tube digestif. La maladie de Crohn est une maladie gastro-intestinale chronique avec une étiologie inconnue [242]. Le microbiote intestinal est fortement soupçonné de jouer un rôle dans le lancement et le déclenchement de l'inflammation [243]. En utilisant une approche de métagénomique, il a été observé une diminution globale de la biodiversité de la flore fécale chez les patients atteints de cette maladie [244]. Chez ces patients, la diversité génétique des *Firmicutes* était réduite, et concernait plus particulièrement le groupe *Clostridium leptum*. Par ailleurs, l'analyse par FISH combinée avec la cytométrie de flux a montré une réduction quantitative significative dans le groupe *C. leptum* chez les patients comparativement aux sujets sains [244, 245]. La bactérie *Faecalibacterium prausnitzii* est responsable d'une large part de ce déficit [193, 246]. Cette bactérie possède d'importantes propriétés anti-inflammatoires associée aux métabolites qu'elle sécrète. L'administration de *F. prausnitzii* ou des molécules qu'elle sécrète réduit l'inflammation intestinale et améliore nettement la survie d'un modèle animal de souris qui mime les effets de la maladie de Crohn humaine [247]. *Bacteroides fragilis* protège les animaux contre la colite expérimentale induite par *Helicobacter hepaticus*, une bactérie commensale avec un potentiel pathogène [248].

4 Conclusion

Le MIH est un écosystème complexe (10^{11} bactéries/g) qui remplit des fonctions associées au bien être de l'Homme. Sa grande diversité lui permet d'assurer un large panel de missions essentielles allant du métabolisme à la protection contre les pathogènes. Une modification de l'équilibre de la composition du microbiote peut provoquer des effets indésirables pour l'hôte et ce déséquilibre peut être associé à des états pathologiques.

Les techniques d'analyses utilisées pour caractériser l'abondance et/ou la diversité de cet écosystème sont très performantes mais ne sont pas validées par la mesure de critères adéquats. Pour notre étude, la PCR quantitative a été retenue pour sa LOQ basse, sa rapidité, sa capacité à pouvoir cibler plusieurs groupes bactériens et son coût raisonnable.

Problématique

Parmi l'ensemble des mycotoxines produites par *Fusarium*, le DON est un des contaminants les plus fréquemment retrouvé et le plus largement répandu à travers le monde dans les cultures céréalières et les denrées alimentaires. Le risque toxicologique associé à une exposition au déoxynivalénol est bien caractérisé. Mais malgré les efforts de recherche pour caractériser les multiples aspects de l'impact d'une contamination par le DON, il y a une insuffisance d'un point de vue bactériologique. En effet, alors que de nombreuses observations montrent la présence du DON dans le tractus intestinal et l'existence d'interactions entre le DON et les bactéries, les questions concernant son impact sur le MIH n'ont été que très peu abordées.

Connaissant i) la prévalence du DON dans la contamination des denrées alimentaires, ii) le risque d'exposition du MIH aux contaminants alimentaires y compris le DON, iii) le rôle du MIH dans le maintien de la santé chez l'Homme, et iv) les interactions existantes entre le DON et les bactéries, l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (Anses), dans le cadre de sa mission de protection du consommateur, a souhaité évaluer l'impact d'une contamination alimentaire au DON sur le microbiote intestinal humain.

Les questions suivantes ont été plus particulièrement examinées au cours de cette thèse :

1) <u>Comment garantir la fiabilité de nos résultats ?</u>

- Pour cela, nous avons réalisé une validation méthodique et rigoureuse de toutes les méthodes analytiques développées et utilisées au cours de cette thèse (analyses physicochimiques du DON, analyses moléculaires du microbiote intestinal), fondée sur une analyse statistique d'un certain nombre de critères (exactitude (justesse+fidélité), linéarité, LOQ…). Pratiquée en routine pour les analyses physicochimiques, l'approche de validation en biologie moléculaire présente un caractère innovant et a donc fait l'objet d'une publication (article 2).

2) <u>Comment se distribue le DON dans l'organisme, une fois ingéré, et à quelle concentration est exposé le MIH ?</u>

- Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des études de cinétique du DON chez le porc (modèle physiologique qui se rapproche le plus de l'Homme) et chez le rat (modèle utilisé en toxicologie et pour notre étude d'impact) afin de définir les paramètres cinétiques (article 1). Ces paramètres nous ont permis d'estimer le niveau d'exposition des

bactéries intestinales et afin de corroborer ces estimations, la présence de DON dans les fèces a également été quantifiée.

3) Le DON a-t-il un effet sur le microbiote intestinal humain et quelles bactéries du microbiote intestinal pourraient être influencées par la présence du DON ? Est-ce que la NOAEL établie lors de l'étude *in vivo* de toxicologie est également sans effet sur le microbiote intestinal ? Est-ce que la variabilité individuelle de composition du microbiote intestinal humain peut influencer les effets du DON ?

- Pour cela, nous avons réalisé une étude d'impact du DON sur un modèle de rats à flore humanisée issue de différents donneurs en utilisant la NOAEL de 100 µg/kg de poids corporel. Les concentrations des populations bactériennes dominantes et sous dominantes du microbiote intestinal ont été évaluées par PCR en temps réel dans les fèces des rats traités par gavage avec du DON. L'article 3 résume cette étude.

Dans ce contexte, cette thèse a permis de compléter les connaissances des risques sur la santé humaine associés à l'exposition aux mycotoxines et d'améliorer les outils d'analyses d'impact de contaminants sur le microbiote intestinal humain.

Résultats

ARTICLE 1

Évaluation de la biodisponibilité orale absolue du déoxynivalénol chez le porc et chez le rat.

Manuel J. Saint-Cyr, Agnès Perrin-Guyomard, Jacqueline Manceau, Jean-Guy Rolland, Michel Laurentie.

TOXICOLOGY LETTERS

(soumis)

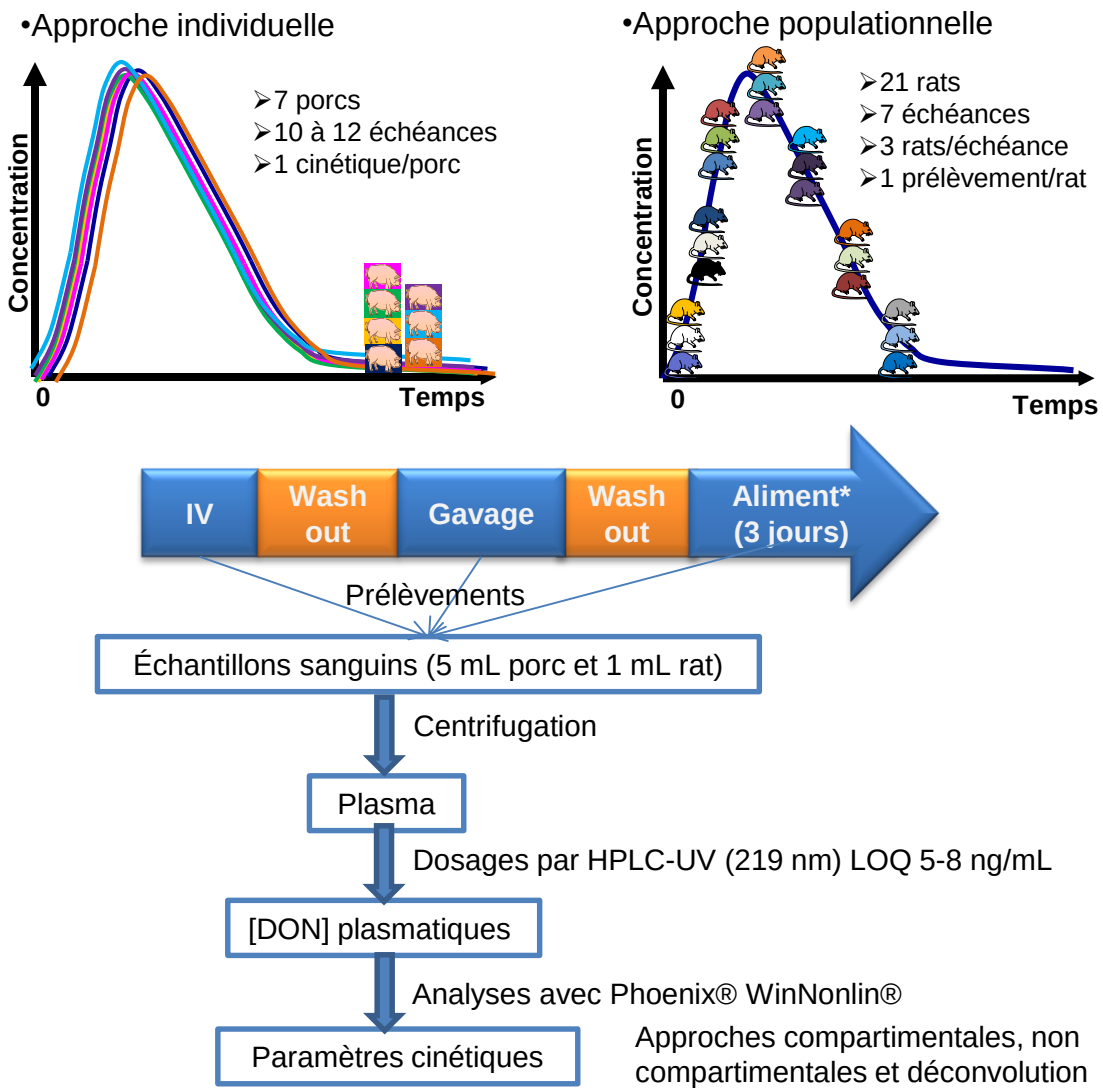


Figure 20 : Protocole expérimental réalisé pour les études de cinétique du DON chez le rat et chez le porc. (*l'expérience avec l'aliment contaminé n'a pas été réalisée chez le rat).

Contexte

Le déoxynivalénol (DON) est l'une des mycotoxines les plus répandues dans les cultures céréalières à travers le monde. En raison de ses propriétés toxiques, de sa grande stabilité et de sa prévalence, la présence de DON dans la chaîne alimentaire représente une menace importante pour la sécurité alimentaire et donc un risque sanitaire pour l'Homme et les animaux. Ce risque a été caractérisé par des études toxicologiques et une dose toxicologique sans effet (NOAEL) a été établie à 100 µg/kg de poids corporel (pc) basée sur une diminution du gain de poids rapportée dans une étude d'alimentation de 2 ans chez la souris. En dépit de ses effets toxicologiques bien connus et des données épidémiologiques bien établies, les informations concernant la pharmacocinétique du DON sont plus limitées. En outre, la biodisponibilité, un paramètre principal en cinétique, a été rarement définie alors que le DON est un contaminant alimentaire ingéré par voie orale. De plus, les paramètres cinétiques du DON demeurent incertains en raison du manque de données valides dans la littérature. Le but de cette étude était d'évaluer la cinétique du DON chez 2 modèles animaux (porc et rat) après administration intraveineuse (IV) et orale à la NOAEL (100 µg/kg) (figure 20).

Méthodologie / Principaux résultats

Des approches compartimentales et non compartimentales ont été utilisées pour déterminer les paramètres cinétiques chez 7 porcs et 21 rats. Cent µg/kg de poids corporel de DON ont été administrés aux animaux par voie intraveineuse et par gavage. Chez le porc, les expérimentations animales ont été menées en cross-over avec une période de wash-out d'une semaine. Les échantillons de sang ont été prélevés sur chaque animal, pour le porc alors que chez le rat, en raison du volume sanguin réduit pouvant être récupéré, chaque animal a été prélevé une fois et trois animaux ont été utilisés par échéance de prélèvement. Les échantillons sanguins ont été centrifugés et le plasma stocké à -20°C jusqu'à analyse par HPLC-UV.

Après administration intraveineuse de DON, le profil de concentration de DON dans le plasma de porc a été décrit par un modèle à deux compartiments avec une distribution initiale rapide (0.030 ± 0.019 h), suivie d'une phase d'élimination terminale plus lente (1.53 ± 0.54 h) et une clairance plasmatique rapide (0.42 ± 0.17 l/kg h). Chez le rat, une courte demi-vie (0.46 h) et une clairance élevée 2.59 l/kg h ont été estimées par une analyse non

compartimentale. Après une exposition orale, le DON a été rapidement absorbé et les concentrations plasmatiques maximales (C_{max}) 42.07 ± 8.48 et 10.44 ± 5.87 µg/l ont été atteintes après (t_{max}) 1.44 ± 0.52 et 0.17 h chez les porcs et les rats respectivement. La biodisponibilité (F) du DON a été estimée à 70.52 ± 25.58% chez le porc et à 47.32% chez le rat.

Assessment of deoxynivalenol absolute oral bioavailability in pigs and rats.

Manuel J. Saint-Cyr[1], Agnès Perrin-Guyomard[1], Jacqueline Manceau[2], Jean-Guy Rolland[2], Michel Laurentie[2]

[1] Anses, Fougères Laboratory, Antibiotics, Biocides, Residues and Resistance Unit, Fougères, France

[2] Anses, Fougères Laboratory, Scientific Support Unit, Fougères, France

Abstract

Due to its toxic properties, high stability and prevalence, the presence of deoxynivalenol (DON) in the food chain represents an important threat to food safety and therefore represents a health risk for both humans and animals. But informations on kinetics are limited. In this study, experiments were carried out with 7 female pigs and 21 female rats to examine the kinetics of deoxynivalenol (DON) after intravenous and oral administration at the NOAEL of 100 µg/kg. Both compartmental and non-compartmental approaches were used to determine the kinetic parameters.

After intravenous (IV) DON administration, concentration profile of DON in pig plasma was fitted by a two-compartment model with a rapid initial distribution (0.030 ± 0.019 h), followed by a slower terminal elimination phase (1.53 ± 0.54 h) and a rapid plasma clearance (0.42 ± 0.17 l/kg h). In rats, a short elimination half-life (0.46 h) and a high clearance of 2.59 l/kg/h were estimated by a sparse sampling non compartmental analysis. Following oral exposure DON was rapidly absorbed and reached maximal plasma concentrations (C_{max}) of 42.07 ± 8.48 and 10.44 ± 5.87 µg/l plasma after (t_{max}) 1.44 ± 0.52 and 0.17 h in pigs and rats. The mean bioavailability (F) of DON was 70.52 ± 25.58% for pigs and 47.32% for rats.

From our findings, in the framework of risk assessment of DON, the two animal models could be useful in scenario of high exposure in two different ways. Pigs with their high bioavailability could be considered as a best experimental model for toxicological studies while rats with their lower bioavailability could be recommended to study impact of DON on intestinal microbiota.

1. Introduction

Deoxynivalenol (DON) is a mycotoxin of the trichothecene family which is a fungal secondary metabolite. Produced by the species *Fusarium*, it is one of the most prevalent mycotoxins present in cereal crops worldwide, and the most frequently occurring type B trichothecene in Europe. A large scale data survey indicated that DON is present in 57% of food samples collected in the European Union (Schothorst and van Egmond, 2004). Epidemiological studies linking DON exposure to adverse health outcomes in humans have been reported in China, India, Japan and Korea (Bhat et al., 1989; Luo, 1988; Ramakrishna et al., 1989). Human gastroenteritis with nausea, diarrhea and vomiting are the main symptoms linked to Fusarium-contaminated foods. In addition to the symptoms described in humans, DON toxicity in animals is reflected by feed refusal and consequently growth retardation (Pestka, 2007). At the cellular level, DON is has been shown to inhibit protein synthesis and to modulate immune responses (Pestka, 2010). Due to its toxic properties, high stability and prevalence, the presence of DON in the food chain represents an important threat to food safety and therefore represents a health risk for both humans and animals (CAST, 2003). This risk was characterized by toxicological, epidemiological and kinetic studies reviewed by Petska (Pestka, 2007). A No Observable Adverse Effect Level (NOAEL) has been established at 100 µg/kg of body weight (bw) based on a decrease body weight gain reported in a 2-year feeding study in mice (Iverson et al., 1995).

Despite its well-known toxicological effects and well-established epidemiological data, information on pharmacokinetic of DON are more limited whereas knowledge of the kinetic parameters of a toxic agent like DON is essential to evaluate animal and human health risks. In addition, bioavailability, a main parameter was rarely defined whereas DON is a food contaminant ingested orally. In addition, the few kinetics study that are available focused on farm animals such as chickens, pigs or sheeps (Goyarts and Dänicke, 2006; Osselaere et al., 2013; Prelusky et al., 1990; Prelusky et al., 1988b; Prelusky et al., 1985) whereas toxicological studies focused on rodents (Pestka et al., 2008) that enables to link dose and effects. Furthermore, two points

make that parameters defined were potentially unreliable, firstly the use of data below the limit of quantification to perform kinetic analysis, and secondly inadequate process to estimate kinetic parameters by misuse of the mean and kinetic classical approach on sparse sampling.

The aim of this study was to assess DON kinetic in 2 animal models after intravenous (IV) and oral gavage administration at NOAEL dose. On one hand, we used pigs because they have vascular anatomy and physiology similar to humans, and, on the other hand, we used rats, because they are classically used to perform toxicological studies. The obtained parameters may contribute to improve the knowledge on DON kinetic at no observable adverse effect level.

2. Material and methods

2.1 Animals

All animal procedures were carried out in strict accordance with the recommendations of the French Ministry of Agriculture. The protocol was approved by Anses's Committee for Ethical Standards and performed in our approved animal breeding facility (Permit Number: D35-137-26).

Female Sprague-Dawley rats catheterized in the jugular vein were obtained from the breeding facility of Janvier Labs (Saint Berthevin, France). Pelleted feed free of mycotoxins-contamination (SAFE, Scientific Animal Food and Engineering, Augy, France) and water were provided *ad libitum*. Twenty one catheterized rats (8 weeks old, 120-150 g bw) were housed per 3 in polycarbonate cages. Female pigs Large White Landrace Pietrain, were obtained from the breeding facility of the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, Saint-Gilles, France). Pelleted feed free of mycotoxins-contamination (Cooperl Arc Atlantique, Vitré, France), were distributed twice daily in two equal meals (600 g) while water was provided ad libitum. Seven pigs (26-28 kg bw) were housed individually. Animals were acclimatized for one week.

2.2 Surgery

To facilitate the blood collection, the pigs were cannulated at the jugular vein. The surgery was performed under sterile conditions. The pigs were pre-anesthetized by an intramuscular application of a mix of xylazin (0.1 ml/kg bw) (Rompun 2%, 20 mg/ml, Bayer HealthCare, Monheim, Germany) and ketamin (0.1 ml/kg bw) (Imalgène 1000, 50 mg/ml, Merial, Lyon, France). Pre-anaesthetized pigs received 0.04 ml/kg bw of atropin (atropine sulfate aguettant, 1 mg/ml, Aguettant, Lyon, France) subcutaneously. Endotracheal intubation was performed (2 mm diameter) and the tube connected to a large animal anesthetic circle system equipped with a

mechanical ventilator (Parker Hannifin, Contamine-sur-Arve, France). The anesthesia was maintained by administration of isofluran (Aerrane, Baxter S.A., Maurepas, France) in pure oxygen (2 l/min) during the surgery. Then, two sterile catheters one used for blood samples collection (1.02 mm × 2.16 mm, 80 cm, No. 28-0148) and one for DON administration (0.76 mm × 1.65 mm, 80 cm, No. 28-0147) were purchased from VWR (Strasbourg, France). They were used for cannulation of the jugular vein. The catheters were fixed with ligatures in the jugular vein and tunneled subcutaneously, exteriorized dorsally in the neck and fixed at the skin. Heparinized physiological saline solution (B. Braun Avitum, Gradignan, France) was used to maintain patency of the catheters. Animals were allowed to recover for at least 3 days before the kinetic study was initiated.

2.3 Chemicals, products and reagents

Deoxynivalenol was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and dissolved in acetonitrile HPLC grade (Sigma-Aldrich) at 1 mg/ml. This solution was stored for a maximum of 1 year at -18°C according to the manufacturer's instructions. The administration solutions used in the kinetic studies were diluted in physiological saline solution (B. Braun Avitum) the day of the experiment. Methanol (analytical reagent grade) was purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). Oasis® HLB 30 mg and Sep-Pak® C18 100mg cartridges were obtained from Waters (St Quentin-en-Yvelines, France). Mycosep 227 Trich + columns were purchased from Romer Labs® Diagnostic (Tulln, Austria). Millex-HV syringue filter, PVDF, 0.45µm came from Millipore (Molsheim, France).

2.4 Study design

2.4.1 Pigs

The animal experiments were performed in a two-way cross-over design and solutions of DON was administered at 100 µg/kg bw intravenously (IV) or orally (PO). In brief, four animals received an oral bolus and three animals received the

mycotoxin intravenously. After a wash-out period of one week, the animals that previously received an oral bolus, received an intravenous bolus and vice versa. Blood samples were collected on each pig before and at 1 min, 2 min, 4 min, 8 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h and 24 h after IV administration and before and at 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 10 h and 24 h after oral administration in heparinized tubes (10 UI of heparin per ml). In order to evaluation the accumulation of DON, subchronic DON exposure (100 µg/kg bw) was performed with DON contaminated diets for 3 days. Blood samples were collected on each pig on day 1 before and at 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 10 h, 24 h, on day 2 at 15 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h et 24 h and on day 3 at 15 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 10 h, 24 h and 48 h after administration. Fecal samples were collected 6 h after DON administration during 3 days.

The blood samples (approximately 5 ml) collected were centrifuged (3000 g for 10 min) and the plasma stored at -20°C until analysis.

2.4.2 Rats

As a reduced volume of blood can be collected in rodents compared to pigs, kinetic study was carried out according to a sparse sampling protocol, in which each rat was sampled only once. Three animals were sampled per time point. Administration solution of DON was administered at the dose of 100 µg/kg bw intravenously (IV) and orally (PO) after a wash-out period of one week. Blood samples were collected at 0 min, 1 min, 4 min, 8 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h after IV administration, and at 0 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h after oral administration in heparinized tubes (10 UI of heparin per ml). The blood samples (approximately 1 ml) collected were centrifuged (3000 g for 10 min) and the plasma stored at -20°C until analysis.

2.5 Determination of DON concentration

2.5.1 Plasma analysis

Plasma samples were analyzed for DON by a validated in house high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detection (UV) method.

2.5.1.1 Sample preparation

For pig plasma, 0.5 ml of sample was directly applied on SPE Oasis® HLB cartridge. The column was washed once with 1 ml of water, following by another step wash with 0.5 ml of water/methanol (80/20, v/v). After the cartridge was dried, DON was eluted using 0.5 ml of acetonitrile. The eluate was evaporated using a gentle nitrogen (N2) stream (~45°C). The dry residue was reconstituted in 0.25 ml of ultra-pure water (Milli-Q system, Millipore, Molsheim, France).

For rat plasma, proteins were at first precipitated by addition of 2 volumes of a mixture water/methanol (80/20, v/v) to 1 volume of plasma. The samples were stored for 15 min at +4°C, followed by a centrifugation step (3000 g for 10 min). Then, the supernatant was applied on SPE cartridge and prepared as described previously for pig plasma.

After vortex mixing, samples were transferred to autosampler vials and injected onto the HPLC instrument.

2.5.1.2 Chromatographic conditions

The HPLC system consisted on an Agilent technologies series 1100 (Les Ulis, France), equipped with a diode array detector. Chromatographic separation was achieved on a Lichrospher® 100 RP-18 endcapped (5 µm) column (125 x 4 mm) (Merck Millipore, Molsheim, France) with a detection set at 219 nm. The mobile phase consisted on a linear gradient of water (A) and acetonitrile (B).The proportion of B increased from 2% (0 min) to 15% (3 min) ,was steady to 7.5 min, then column

was re-equilibrated for 5 min with initial conditions. All separations were carried out at 25°C applying a flow-rate of 0.8 ml/min.

2.5.2 Feces analysis

Fecal samples were analyzed by a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method.

2.5.2.1 Sample preparation

For pig feces, DON was extracted by adding 1 ml of water and 8.4 ml of acetonitrile to 1 g of sample. After rotative stirring (15 min) and centrifugation (5000 g for 10 min), the supernatant was purified on Mycosep column according to the manufacturer's instructions. Then, 2 ml was evaporated under nitrogen stream (~45°C). Dry residue was reconstituted in 0.2 ml of ultra-pure water and filtered on Millex® before injected in LC instrument.

For rat feces, 5 ml of water was added to 0.5 g of sample. After rotative stirring (15 min) and centrifugation (20000G for 10 min), the supernatant was purified on C_{18} Sep-Pack cartridge. After washing by 2 ml of water, DON was eluted with 1 ml of acetonitrile. The residue was evaporated under nitrogen stream, then dissolved in 0.2 ml of water and filtered with Millex before injection in LC instrument.

2.5.2.2 Chromatographic conditions

Liquid chromatography analysis was performed using a Ultimate 3000 LC (Thermoscientific Villebon-sur-Yvette, France). DON was separated using a Zorbax Eclipse XDB C8 column (150 x 2 mm, 5µm particle size) at a flow-rate of 0.2 ml/min. Ten microliters was injected. The mobile phase consisted on a linear gradient of acetic acid 0.1% and acetonitrile. The proportion of acetonitrile increased from 2% (0 min) to 50% (5 min), and then the column was re-equilibrated for 5 min with initial conditions. The retention time of the analyte was 4.9 min.

The HPLC system was coupled to a Triple Stage Quadrupole (TSQ) Vantage mass spectrometer (Thermoscientific) with electrospray ionization (ESI) source set in

negative mode. Two SRM transition (*m/z*) were monitored for DON *i.e. m/z* [M + $CH_3COO]^-$=355.05>295.10 and 355.05>265.10. The following settings were used: ion spray voltage 3500 V, collision energy 10 eV, vaporizer temperature 300°C, tube lens voltage at 60 V, sheath and auxiliary gas pressure 40 and 35 psi, respectively. Software used for the system control and data processing was XCalibur v2.1.

2.5.3 In-house method validation

The method was validated using an approach based on accuracy profiles. The validation data were processed by e-noval V3 (Arlenda, Liege, Belgium) Accuracy is composed of trueness and precision. Trueness is expressed in term of recoveries and the mean recovery of the method was 90.5% in pig plasma and 97.9% in rat plasma. Precision is evaluated by repeatability and intermediate precision at each concentration level. Repeatability and intermediate precision values are acceptable for the field of pharmacokinetic studies since they are distributed between 3.3 and 7.6% for pig plasma and between 1.8 and 11.1% for rat plasma.

The dosing range to determine the upper and lower limits of quantification was between 5 and 250 µg/l for pig plasma and between 5-100 µg/l for rat plasma. Limits of quantification (LOQs) of DON were established at 6.7-247.5 µg/l and 5.2-99 µg/l in pig and rat plasma respectively.

For pig feces, the dosing range used was 10 to 500 ng/g and defined lowest and highest limits of quantification (LOQs). The mean recovery of the method was 97.92% and 88.75% for mass transition 1 (295) and 2 (265) respectively. Repeatability and intermediate precision values were ranged from 2.0% to 5.4% for transition 1 and 0.7% to 3.8% for transition 2.

2.6 Kinetic analysis

For all the studies involved, concentrations under LOQ were not retained for calculations. Both compartmental and non-compartmental approaches were used to

determine the kinetic parameters. All kinetic analyses were performed with the software Phoenix WinNonlin 6.3 (Certara, Saint Louis, USA).

2.6.1 Compartmental analysis

For pigs, two- and three-compartment models were tested for the intravenous route, whereas mono- and bi-compartment models (with and without lag time) were compared for oral administration. Models comparison and evaluation were accomplished through application of the Akaike's Information Criterion (Yamaoka et al., 1978).

2.6.2 Non Compartmental Analysis (NCA)

The total area under the plasma-time curve (AUC) for DON was determined by using the linear trapezoidal rule with extrapolation to infinity. The extrapolation $AUC_{(last\text{-}inf)}$ was performed using the following equation:

$$AUC_{(last-inf)} = \frac{C_{last}}{\lambda_{iv}} \quad (1)$$

where C_{last} is the last observed plasma concentration and λ_{iv} the slope of the terminal phase. The terminal slope was estimated from the linear part of the terminal phase by at least three points and was accepted for a coefficient of determination (r^2 >0.95). The Mean Residence Time (MRT) was calculated using the linear trapezoidal rule between 0 and C_{last} or with extrapolation to infinity. Clearance and V_{ss} *i.e*. the volume of distribution at steady state were also estimated.

For *p.o.* administration the observed maximum concentration (C_{max}) and the corresponding time (t_{max}) were obtained from the concentration-time profile and compared to those obtained in compartmental analysis. Bioavailability factor was defined according to the formula:

$$F = \frac{(AUC)_{p.o.} \times (Dose)_{i.v.}}{(AUC)_{i.v.} \times (Dose)_{p.o.}} \times 100 \quad (2)$$

where $AUC_{p.o.\ or\ i.v.}$ represents the area under concentration-time curve 0 to the last quantifiable concentration (AUC_{last}) or 0 to infinity (AUC_{INF}) after oral or intravenous administration of DON. $Dose_{p.o.\ or\ i.v.}$ represents actual dose administered by oral or intravenous route.

For rats, a sparse data analysis was performed because we have only one point per animal and three animals by time points. In this kind of study it was not possible to distinguish inter-individual from intra-individual variability and consequently the present analysis focused on mean parameters and not on the inter-individual variability.

2.6.3 Deconvolution analysis

To assess the absolute bioavailability and the *in vivo* input rate of DON, a deconvolution analysis was performed. This tools was largely used for assess the gastrointestinal absorption of drug in pigs (Larsen et al., 1992) or to evaluate the secretory profile of hormone (Laurentie 1990). Briefly, deconvolution allows estimating the drug input rate over time using the unit impulse response function (UIR) by a convolution equation:

$$c(t) = \int_0^t f(t-u)c_\partial(u)du \equiv f(t) * c_\partial(t) \quad (3)$$

where * denotes the convolution operator, f(t) is the UIR *i.e.* the disposition function and $c_\delta(t)$ is the drug input rate.

By deconvolving c(t) with f(t), an *in vivo* input rate of the DON can be determined. The disposition function was obtained from the pharmacokinetic parameters of DON after IV administration.

2.7 Statistical analysis

Pharmacokinetic parameters are expressed as arithmetic mean and its standard deviation except for half-lives where harmonic mean and its standard deviation were

calculated (Lam et al., 1985). Comparison of pharmacokinetic parameters between rats and pigs (AUC, C_{max}), after IV and oral administration (half-life of elimination) was performed by a t test or with a non-parametric test (Mann-Whitney test) when the variance are not homogeneous. For bioavailability obtained from compartmental, non-compartmental approach and deconvolution, a Levene's test was used to verify the homogeneity of variance following by a one way ANOVA. A level of significance of 0.05 was retained. All statistics were carried out using SYSTAT V.13 (Systat Software, Chicago, USA).

3. Results

3.1 Clinical signs

Deoxynivalenol was tolerated by all animals, however, a difference in manifestation of side-effects was evident when compared species or ways of administration. All pigs administered 100 µg DON/kg bw intravenously showed signs of acute DON toxicosis, like salivation, retching and emesis within a few minutes (8-15 min). In contrast, no signs of toxicity were observed in pigs following an oral administration or in rats irrespective of the route of administration at the same dose.

3.2 Concentration profile after IV administration of DON

Following intravenous dosing, based on the Akaike's information criterion the concentration profile of DON in pig plasma was fitted by a two-compartment model (Fig. 1) described by a bi-exponential equation:

$$C(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} \quad (4)$$

where C(t) is the DON concentration at time t; A and B the extrapolated values to time 0 of the first and second phases of DON concentration disposition and α, β are the rate constant of distribution and elimination phases respectively. From equation 4, kinetic parameters were calculated and reported in table 1. Initial distribution was rapid with a mean half-life ($t_{1/2}\alpha$) of 0.030 ± 0.019 h, followed by a slower terminal elimination phase ($t_{1/2}\beta$) of 1.53 ± 0.54 h (table 1). The plasma clearance (Cl) of DON was rapid (0.42 ± 0.17 l/kg h in mean) (table 1). The volume of distribution at the steady state was equal to 0.88 ± 0.17 l/kg.

The NCA (table 2) confirmed the results obtained from the compartmental analysis for the different estimated parameters. No statistical differences were observed between parameters. MRT was estimated to 2.24 ± 1.15 h.

In rats, we assess the kinetic parameters of DON after IV administration by sparse sampling NCA. Results obtained are presented in table 2 and time course evolution of mean DON concentrations in plasma is illustrated in Fig.2. A short elimination half-life (0.46 h), a high clearance of 2.59 l/kg/h and Vss of 1.5 l/kg were estimated. The MRT was also short with values of 0.32 h to 0.58 h for MRT_{last} and MRT_{inf} respectively. It was also observed that extrapolated area has a high contribution (20%) to the total area (AUC_{INF}).

3.3 Concentration profile after oral administration of DON

After oral administration of DON, the plasma concentration vs time curves in pigs were best described by a one-compartment model with first order absorption and elimination without lag time (Fig.3) based on the following equation:

$$C(t) = \frac{FDK_{01}}{V(K_{01}-K_{10})}[e^{-K_{10}(t)} - e^{-K_{01}(t)}] \quad (5)$$

where F is the bioavailability, D the dose; K_{01} the rate of absorption, V the apparent volume of distribution and K_{10} the rate of elimination. Kinetic parameters obtained from the equation 5 are presented in table 3.

The mean half-life of the elimination phase was established to 2.47 ± 1.32 h. No statistical difference was found between the elimination phase obtained by IV or oral routes. Peak concentration (C_{max}) of 23.97-51.31 µg/l plasma were reached (t_{max}) between 0.30 and 2.60 h (table 2). MRT was 5.59 ± 4.01 h suggesting a short presence in body and consequently a rapid absorption. The mean half-life of absorption (0.19 ± 0.38 h) and the t_{max} value confirmed that absorption was very fast.

Table 4 shows a general overview of the mean bioavailability estimated by compartmental, non-compartmental and deconvolution analysis. For pigs, from parameters obtained after modeling the concentration profile the bioavailability was estimated to 84.44 ± 33.98%. From NCA analysis the bioavailability was estimated to 83.99 ± 48.59%. For gavage, the AUC extrapolated between the last point and the infinity to estimate the total AUC (AUC_{INF}) had a contribution higher than 10% (table

2). Consequently, we have also calculated the AUC between 0 to the last point (AUC_{last}). With this parameter the bioavailability was estimated to 58.33 ± 25.64%. From deconvolution analysis, the absolute bioavailability was estimated to 70.52 ± 25.58%. No statistical difference was observed for bioavailability obtained by modeling, NCA or deconvolution analysis.

Presence of double peaks on all DON plasma concentrations curve of pigs at the beginning of kinetic after oral administration suggested non-continuous absorption phases in all pigs. Deconvolution analysis confirmed the presence of double absorption as presented in Fig. 4 and reported in table 5. The first absorption phase had duration of 0.32 ± 0.12 h and represented close to 25% of the global absorption (71%). The second absorption phase was more important (46%) and 10 fold longer (4.61 ± 1.56 h).

Pig plasma concentrations of DON obtained from the subchronic DON exposure with contaminated diets were below the LOQ of the method. In addition, DON was not detected in the fecal samples analyzed.

For rats, the extrapolated part of AUC_{INF} was large for gavage (70%), hence, bioavailability was calculated with AUC_{last}. The value was 14.63 ± 4.45 µg h/l and the corresponding bioavailability was estimated at 47.32% ranged 45.07 %to 49.16 %, interval obtained from confidence interval of AUC_{last}. Peak concentrations (C_{max}) of 10.44 ± 3.39 µg/l of DON were reached (t_{max}) at 0.17 h indicating a rapid absorption. MRT_{last} was established at 0.95 h.

4. Discussion

This study assessed DON kinetic in 2 animal models after intravenous (IV) and oral gavage administration at NOEL dose.

Ours clinical observations were in accordance with Petska *et al*. (1987) who reported that 50 µg/kg live weight of DON was the minimum effective dose that provoked emesis in pigs (Pestka et al., 1987). Only IV administration route provokes emesis, this is due to a rapid distribution and high concentration in brain with a central action of different main neurotransmitters as noradrenaline, dopamine or serotonin (Goyarts and Dänicke, 2006; Prelusky and Trenholm, 1993).

For the kinetic study, we only focused on plasma DON concentrations because the metabolites of DON in pigs and rats are minimal compared to parent molecule. After IV administration of DON in pigs, Prelusky *et al.* (1988) adapted a two- and a three-compartment model whereas Goyarts and Danicke (2006) described a two-compartment as we shown in the current study (Goyarts and Dänicke, 2006; Prelusky et al., 1988a). It could be suggested that the fitting model depends on the frequency of blood sampling during the initial minutes after dosing as well as the performance of the analytical methods in particular the limit of quantification. Prelusky *et al*. (1988) analyzed the disappearance of radioactivity in plasma after application of ^{14}C-labeled DON but revised this method because of the inaccuracy at low doses (Prelusky et al., 1990). The kinetic parameters determined in our study indicated that DON was low distributed and rapidly eliminated from plasma. These observations suggested that there is no accumulation in tissues such as proposed by *Prelusky et al*. (1988) (Prelusky et al., 1988b). However, the comparison with the results from previous studies is not possible because the data used were not all above the LOQ.

In contrast to pigs, information on the IV kinetic parameters of DON in rats is scarce. For rats, using a sparse sampling procedure, we observed a large contribution of the extrapolated data on estimation of the kinetics parameters. Consequently, only the parameters estimated between 0 and the last point above the LOQ were considered.

Considering this point, the 2 animal species showed large differences as AUC_{last} was 7 fold higher in pigs than in rats.

After oral administration in pigs, the elimination rate (2.47 h) is rather similar from the elimination rate of IV administration (1.5 h). This result was not in accordance with Goyarts and Danicke (2006). This could be explained by the difference in DON administration route (diet vs. oral gavage) (Goyarts and Dänicke, 2006). Furthermore, means of half-lives should be calculated by harmonic mean as recommended by Lam *et al*. (1985) (Lam et al., 1985) and not by classical arithmetic mean as used by Goyarts and Danicke (2006). By using harmonic mean on Goyarts' data, no difference was observed. The absorption is very rapid (half-life close to 15 min) and was in accordance with the rapid apparition (t_{max} 0.3 to 2.6 h) of peak plasma concentration (C_{max}) of DON, these results are in the same range as reported in the literature. Following an intragastric application of 600 µg/kg of DON, Prelusky *et al.* reported (1988) a peak concentration within 15-30 min with maximal plasma DON concentration range from 63–325 µg/l). In another kinetic study in pigs, Prelusky *et al.* (1990) measured maximal DON concentrations (C_{max}) of 367±37 µg/l after 3.75±1.26 h (t_{max}) following an intragastric application of 1000 µg/kg of DON (Prelusky et al., 1990).

For rats, DON was also rapidly absorbed with a maximal plasma concentration reached at 0.17 h after oral administration. In mouse, Petska 2008 reported two-compartment kinetics with an initial rapid clearance rate (21.6min), a C_{max} of 12 µg/ml reached within 5-15 minutes following oral exposure to 25 mg/kg bw of DON. These results are in agreement with our kinetic study of DON in rats. Rats exhibited a lower C_{max} than pigs (1:4) while the AUC_{last} was 8 fold lower.

To our knowledge, it's the first study where a comparison of oral bioavailability of DON was performed between two different animal models at the same dose. The bioavailability of the DON seemed to be higher in pigs than in rats. However, in rats, the absolute bioavailability value could not be considered because of the high part of extrapolation in AUC_{INF} calculation. Rats showed a low bioavailability estimated at 47%, suggesting that more than half of DON dose remained in intestine of rats. When comparing to the bioavailability of DON in pigs calculated with AUC_{last} (58%), this

difference could involve an impact of DON on the intestinal microbiota higher in rats than in pigs as it was reported in literature (Saint-Cyr et al., in press; Waché et al., 2008)

The absolute bioavailability of DON in pigs (70%) estimated in this study were in accordance with results from Prelusky *et al*. (1988) and Goyarts and Danicke (2006) who found a bioavailability of 54.8±8.6% and 54.1±17.5% respectively (Goyarts and Dänicke, 2006; Prelusky et al., 1988b). As the determination of the absolute bioavailability was done after modeling the data, values may be incorrectly estimated because the model did not fit correctly the data. In particular, in our study, the presence of the double peak was not taken in account. This hypothesis was supported by the fact that the bioavailability reported by their authors are closer to our value obtained from AUC_{last} calculation than obtained from our deconvolution analysis. This double peak was systematically observed during the absorption phase for all pigs indicated that the absorption could start in the stomach or in the upper part of the duodenum (first peak) as suggested by Goyarts *et al* and assumed by the findings of Eriksen *et al*. and Danicke *et al*. (Dänicke et al., 2004; Eriksen et al., 2003; Goyarts and Dänicke, 2006). A second larger portion of the dose has been passed into the blood circulation (second peak). The presence of these non-continuous biphasic absorption patterns could not have been related to a food effect because the pigs were fed at least 4 h after the DON administration. Further studies are needed to assess the clinical significance of these findings. In contrast, no double peak was observed during the absorption phase in rat, it could be possibly due to the frequency of blood sampling during the initial minutes after dosing.

From our findings, in the framework of risk assessment of DON, the two animal models could be useful in scenario of high exposure in two different ways. In one hand, pigs with their high bioavailability could be considered as a best experimental model for toxicological studies than rats. On the other hand, rats with their lower bioavailability could be recommended to study impact of DON on intestinal microbiota considering a large part of the dose ingested remains in the intestine.

In addition, the double peak of absorption observed could explain the capacity of DON to induce emesis after an oral exposure. With rapid and large first peak absorption, the minimum emetic plasma DON concentration can be reached.

Acknowledgments

We would like to thank Jean-Michel Delmas for technical support.

References

Bhat, R., Ramakrishna, Y., Beedu, S., Munshi, K.L., 1989. Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat production in Kashmir Valley, India. The Lancet 333, 35-37.

CAST, 2003. Mycotoxins: risks in plant animal and human systems. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, pp. 199.

Dänicke, S., Valenta, H., Döll, S., 2004. On the toxicokinetics and the metabolism of deoxynivalenol (DON) in the pig. Archives of animal nutrition 58, 169-180.

Eriksen, G.S., Pettersson, H., Lindberg, J., 2003. Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs. Archives of animal nutrition 57, 335-345.

Goyarts, T., Dänicke, S., 2006. Bioavailability of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig. Toxicology Letters 163, 171-182.

Iverson, F., Armstrong, C., Nera, E., Truelove, J., Fernie, S., Scott, P., Stapley, R., Hayward, S., Gunner, S., 1995. Chronic Feeding Study of deoxynivalenol in B6C3F1 male and female mice. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 15, 283-306.

Lam, F., Hung, C., Perrier, D., 1985. Estimation of variance for harmonic mean half-lives. Journal of pharmaceutical sciences 74, 229-231.

Larsen, F., Jensen, B.H., Olesen, H.P., Larsen, C., 1992. Multiple oral administration of a Ketoprofen–Dextran ester prodrug in pigs: Assessment of gastrointestinal unavailability by deconvolution. Pharmaceutical research 9, 915-919.

Luo, X., 1988. Outbreaks of moldy cereals poisoning in China. Issues in food safety, 56-63.

Osselaere, A., Devreese, M., Goossens, J., Vandenbroucke, V., De Baere, S., De Backer, P., Croubels, S., 2013. Toxicokinetic study and absolute oral bioavailability of deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone in broiler chickens. Food and Chemical Toxicology 51, 350-355.

Pestka, J., 2010. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. Archives of Toxicology 84, 663-679.

Pestka, J., Lin, W.-S., Miller, E., 1987. Emetic activity of the trichothecene 15-acetyldeoxynivalenol in swine. Food and Chemical Toxicology 25, 855-858.

Pestka, J.J., 2007. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. Animal Feed Science and Technology 137, 283-298.

Pestka, J.J., Islam, Z., Amuzie, C.J., 2008. Immunochemical assessment of deoxynivalenol tissue distribution following oral exposure in the mouse. Toxicology Letters 178, 83-87.

Prelusky, D., Hartin, K., Trenholm, H., 1990. Distribution of deoxynivalenol in cerebral spinal fluid following administration to swine and sheep. Journal of Environmental Science & Health Part B 25, 395-413.

Prelusky, D., Hartin, K., Trenholm, H., Miller, J., 1988a. Pharmacokinetic fate of ^{14}C-labeled deoxynivalenol in swine. Fundamental and Applied Toxicology 10, 276-286.

Prelusky, D.B., Hartin, K.E., Trenholm, H.L., Miller, J.D., 1988b. Pharmacokinetic fate of 14C-labeled deoxynivalenol in swine. Fundamental and Applied Toxicology 10, 276-286.

Prelusky, D.B., Trenholm, H.L., 1993. The efficacy of various classes of anti-emetics in preventing deoxynivalenol-induced vomiting in swine. Natural Toxins 1, 296-302.

Prelusky, D.B., Veira, D.M., Trenholm, H.L., 1985. Plasma pharmacokinetics of the mycotoxin deoxynivalenol following oral and intravenous administration to sheep. Journal of Environmental Science and Health, Part B 20, 603-624.

Ramakrishna, Y., Bhat, R.V., Ravindranath, V., 1989. Production of deoxynivalenol by *Fusarium* isolates from samples of wheat associated with a human mycotoxicosis outbreak and from sorghum cultivars. Applied and Environmental Microbiology 55, 2619-2620.

Saint-Cyr, M.J., Perrin-Guyomard, A., Houée, P., Rolland, J.-G., Laurentie, M., in press. Evaluation of an Oral Subchronic Exposure of Deoxynivalenol on the Composition of Human Gut Microbiota in a Model of Human Microbiota-Associated Rats. PLoS ONE.

Schothorst, R.C., 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. Toxicology Letters 153, 133-143.

Waché, Y., Valat, C., Postollec, G., Bougeard, S., Burel, C., Oswald, I., Fravalo, P., 2008. Impact of Deoxynivalenol on the Intestinal Microflora of Pigs. International Journal of Molecular Sciences 10, 1-17.

Yamaoka, K., Nakagawa, T., Uno, T., 1978. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics 6, 165-175.

Table 1. Individual and mean pharmacokinetic parameters of DON estimated from a two-compartment model in plasma of seven pigs following intravenous administration of a single dose of 100 µg/kg.

Parameters (units)	1	2	3	4	5	6	7	Mean	SD
A (µg/l)	2.41	2.57	1.53	2.14	1.48	4.76	2.68	2.51	1.10
B (µg/l)	1.19	1.46	0.99	0.62	1.03	1.00	1.15	1.06	0.26
α (l/h)	13.86	30.87	21.86	8.16	25.47	48.85	14.24	23.33	13.65
β (l/h)	0.35	0.52	0.38	0.43	0.47	0.74	0.27	0.45	0.15
AUC (µg h/l)	354.64	290.11	264.71	168.71	224.92	144.07	480.64	275.40	115.41
$T_{1/2}$α (h)	0.050	0.022	0.032	0.085	0.027	0.014	0.049	0.030	0.019
$T_{1/2}$β (h)	1.97	1.33	1.81	1.61	1.48	0.93	2.56	1.53	0.54
Cl (l/kg h)	0.28	0.34	0.38	0.59	0.44	0.69	0.22	0.42	0.17
MRT (h)	2.70	1.87	2.55	1.98	2.08	1.26	3.54	2.28	0.73
Vss (l/kg)	0.76	0.64	0.96	1.17	0.92	0.87	0.80	0.88	0.17

A. B: initial concentration at t=0; α: distribution constant; β: elimination constant; $t_{1/2}$: biological half-life of α (distribution) or β (elimination); AUC: area under the curve; Cl: clearance; MRT: mean residence time; Vss: volume of distribution at steady state.

Table 2. Comparison of pharmacokinetic parameters of DON determined by Non Compartmental Analysis after intravenous or oral administration in rat and pig.

Parameters (units)	Pigs		Rats	
	IV	Gavage	IV	Gavage
Lambda_z	0.43 ± 0.21	0.29 ±0.16	1.51	0.18
HL_Lambda_z	1.49± 0.64	2.38 ± 1.45	0.46	3.95
AUC_{last} (µg h/l)	222.3 ± 106.72	120.5 ± 29.88	30.91 ± 7.87	14.63 ± 4.45
AUC_{INF} (µg h/l)	253.8 ± 123.33	197.2 ± 88.50	38.65	48.81
AUC_{Extrap} (%)	9.76 ± 2.64	33.79 ± 17.60	20.03	70.03
Cl (l/kg h)	0.41 ± 0.17	-	2.590	-
MRT_{last} (h)	1.41 ± 0.61	2.43 ± 0.59	0.32	0.95
MRT_{INF} (h)	2.24 ± 1.15	5.59 ± 4.01	0.58	5.68
Vss (l/kg)	0.78 ± 0.17	-	1.51	-
t_{max} (h)	-	1.44 ± 0.52	-	0.17
C_{max} (µg/l)	-	42.07 ± 8.48	-	10.44 ± 5.87

Results were expressed as the mean of the parameter (n=7 pigs) ± standard deviation. Lambda_z: first order rate constant associated with the terminal (log-linear) portion of the curve; HL_Lambda_z: terminal half-life (ln(2)/terminal slope); AUC_{last}: Area Under the Curve (AUC) from time of dosing (0) to the time of the last quantifiable concentration (*i.e.* above LOQ); AUC_{INF}: AUC extrapolated from time of dosing (0) to infinity; AUC_{Extrap}: Percentage of AUC_{INF} that is due to extrapolation from T_{last} to infinity; Cl: clearance; MRT_{last}: Mean Residence Time (MRT) from time of dosing to the last quantifiable concentration; MRT_{INF}: MRT extrapolated to infinity using the last quantifiable concentration for extrapolation; Vss: volume of distribution at steady state; t_{max}: time of maximum plasma DON concentration; C_{max}: maximum plasma DON level.

Table 3. Individual and mean pharmacokinetic parameters of DON estimated from a one-compartment model in plasma of seven pigs following oral administration of a single dose of 100 µg/kg.

Parameters (units)	1	2	3	4	5	6	7	Mean	SD
V_F	1.63	2.66	1.51	1.04	2.58	1.85	2.77	2.01	0.67
K_{01} (l/h)	2.86	5.22	13.99	0.43	0.85	0.53	2.20	3.72	4.83
K_{10} (l/h)	0.22	0.10	0.38	0.43	0.13	0.50	0.30	0.29	0.15
AUC (µg h/l)	225.12	319.67	198.20	197.36	256.97	127.21	110.66	205.03	72.24
$T_{1/2}K_{01}$ (h)	0.24	0.13	0.052	1.63	0.82	1.30	0.32	0.19	0.38
$T_{1/2}K_{10}$ (h)	3.09	6.62	2.46	1.62	5.28	1.39	2.34	2.47	1.32
t_{max} (h)	0.97	0.76	0.30	2.34	2.60	1.94	1.05	1.42	0.87
C_{max} (µg/l)	40.67	30.91	51.31	31.02	23.97	24.09	23.98	32.28	10.34

V_F: volume of distribution divided by bioavailability (F); K_{01}: absorption constant; K_{10}: elimination constant; AUC: area under the curve; $t_{1/2}$: biological half-life of K_{01} (invasion) or K_{10} (elimination); t_{max}: time of maximum plasma DON concentration; C_{max}: maximum plasma DON level.

Table 4. Comparison of mean bioavailability of DON in rat (n=3 by sampling time) and pig (n=7) after modelling, NCA and deconvolution.

	Bioavailability (%)			
	Modeling	NCA		Deconvolution
	Two compartment	Inf[a]	last[b]	
Pigs	84.44 ± 33.98	83.99 ± 48.59	58.33 ± 25.64	70.52 ± 25.58
Rats	-	126.29	47.32	-

[a] bioavailability calculated with AUC_{INF};[b] bioavailability calculated with AUC_{last}.

Table 5. Determination of the duration and percentage of absorption after deconvolution analysis of concentration profile following oral administration of 100 µg/kg of DON in pigs.

	Animal number							Mean	SD
	1	2	3	4	5	6	7		
Duration 1st phase (h)	0.37	0.24	0.32	0.18	0.55	0.3	0.29	0.32	0.117
Absorption 1st phase (%)	22.60	21.95	54.04	8.80	43.00	12.76	9.92	24.72	17.427
Duration 2nd phase (h)	5.73	3.76	1.76	5.82	5.67	5.7	3.81	4.61	1.555
Absorption 2nd phase (%)	47.64	33.37	23.02	104.45	37.75	55.23	19.16	45.80	28.809

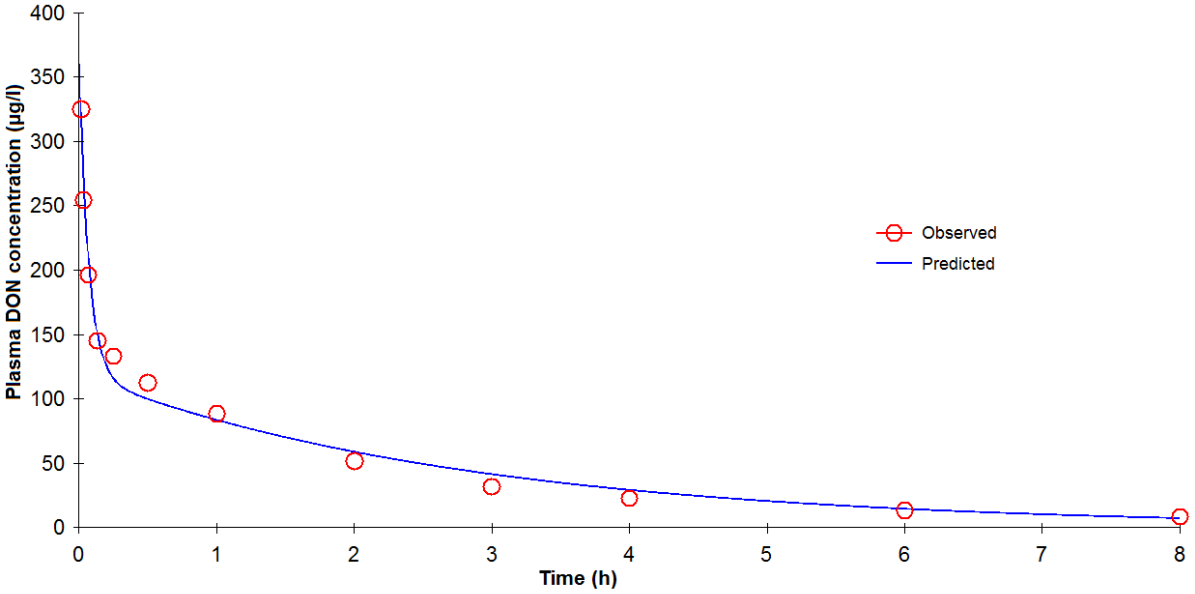


Figure 1. DON concentrations (µg/l) vs time (h) in plasma in a representative pig fitted by a two-compartment model after IV administration of 100 µg/kg of DON.

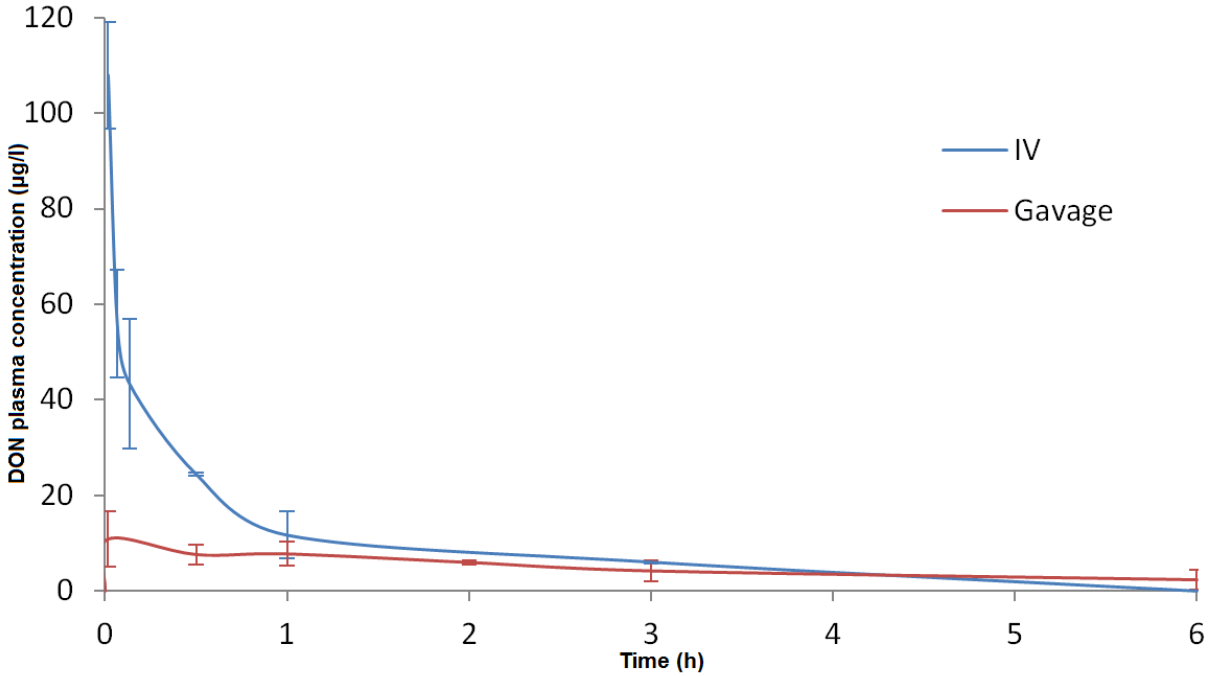


Figure 2. Time course evolution of mean DON concentrations (µg/l) vs time (h) in plasma in rats after IV or oral administration of 100 µg/kg of DON. (n=3 per sampling time).

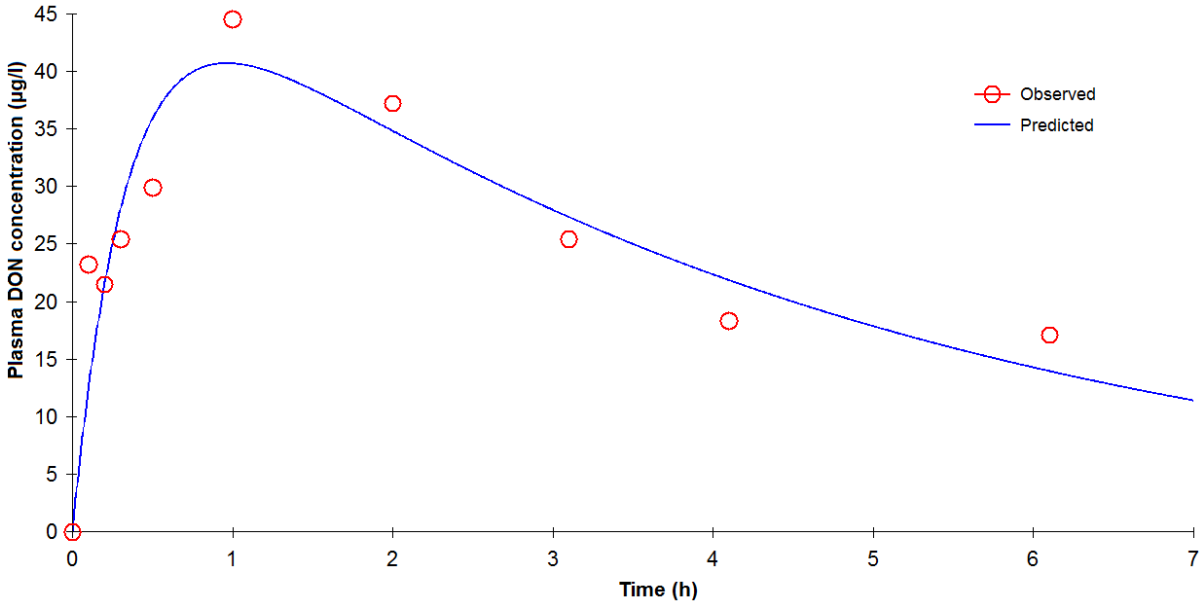


Figure 3. DON concentrations (µg/l) vs time (h) in plasma in a representative pig fitted by the one-compartment model without t lag after oral administration of 100 µg/kg of DON.

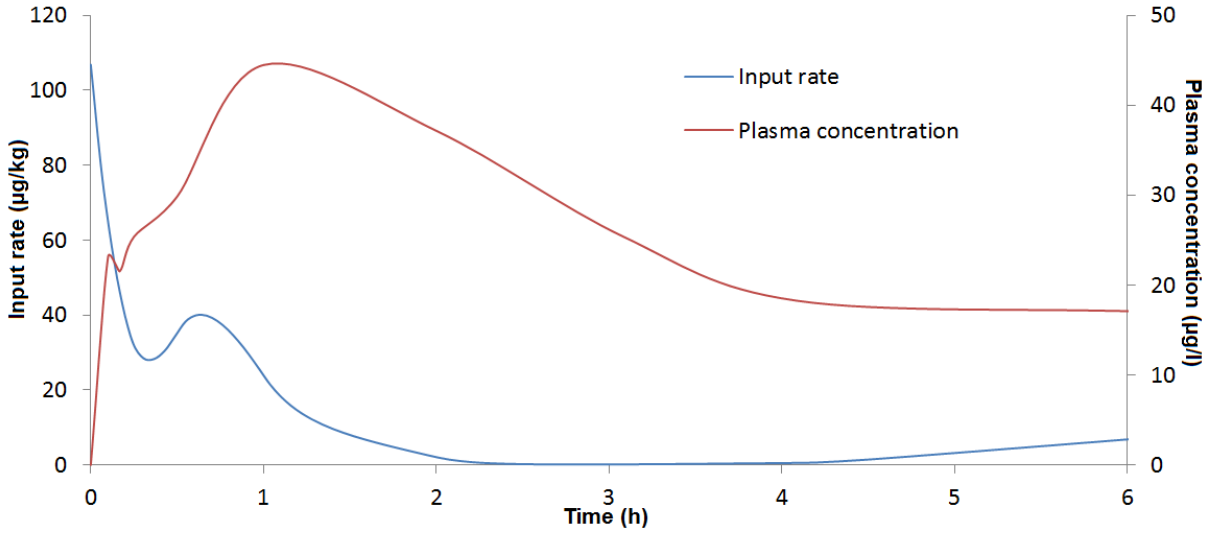


Figure 4. Time course evolution of DON concentrations in plasma and input rate estimated (µg/kg) from deconvolution analysis in a representative pig after oral administration of 100 µg/kg of DON.

Conclusions / Importance

Dans cette étude, le devenir du DON au sein de l'organisme de deux modèles animaux a été caractérisé et sa fraction présente dans le compartiment intestinal estimée. Les résultats obtenus montrent que ces animaux pourraient servir de modèle expérimental dans le cadre de l'évaluation du risque associé à cette molécule, de manière différente, selon des scénarii précis d'exposition. D'une part, les porcs, avec une biodisponibilité élevée, pourraient être considérés comme un modèle expérimental de choix pour les études toxicologiques tandis que les rats, avec une biodisponibilité plus faible, pourraient être recommandés pour étudier l'impact du DON sur le microbiote intestinal. Néanmoins, la technique envisagée pour suivre l'évolution des concentrations bactériennes fécales après exposition au DON chez le rat devra être validée afin de garantir la fiabilité des résultats.

ARTICLE 2

Utilisation du profil d'exactitude pour valider une technique de PCR en temps réel afin de quantifier des bactéries dans les fèces.

Manuel J. Saint-Cyr, Agnès Perrin-Guyomard, Paméla Houée, Malek V. Vasseur, Michel Laurentie

Journal of AOAC INTERNATIONAL

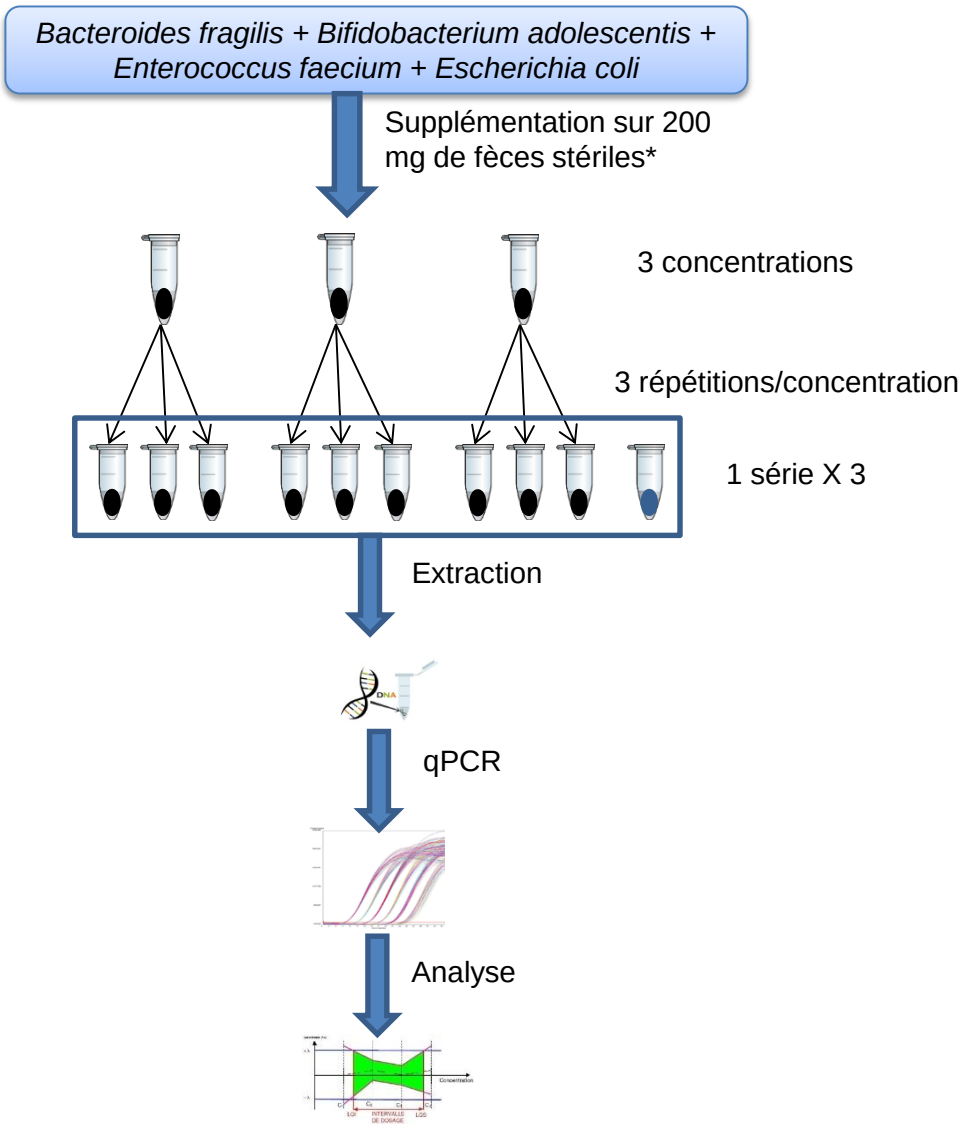


Figure 21 : Protocole expérimental réalisé pour la validation de la qPCR. (*fèces provenant de rats axéniques).

Contexte

Il existe plusieurs méthodes pour dénombrer les bactéries dans les échantillons biologiques et environnementaux. Dans le cas des fèces, la PCR en temps réel (qPCR) est une méthode d'analyse moléculaire sensible et spécifique, qui permet la détection et le dénombrement d'une large gamme de micro-organismes. Cette méthode de quantification nécessite une étape de validation pour garantir la fiabilité des résultats fournis. Le profil d'exactitude est un outil statistique utilisé en physico chimie qui permet de garantir en routine les résultats obtenus sur la base des performances de la méthode analytique. Dans cette étude, nous avons utilisé le profil d'exactitude pour valider statistiquement la mesure des concentrations bactériennes d'échantillons fécaux obtenues par qPCR.

Méthodologie / Principaux résultats

La performance de la qPCR pour la quantification de bactéries dans les fèces a été évaluée sous conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire en supplémentant des échantillons fécaux axéniques avec une quantité connue d'espèces bactériennes cibles (*Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Enterococcus faecium* et *Escherichia coli*) (figure 21).

Les bactéries ont été cultivées en bouillon jusqu'en phase exponentielle de croissance, puis utilisées pour les extractions d'ADN et les supplémentations. L'ADN génomique des souches de référence a été extrait avec le kit « *Wizard Genomic DNA Purification* » de Promega. Cet ADN extrait a été utilisé afin de réaliser des courbes standards de calibration allant de 0.1 $\log_{10}$ à 8 $\log_{10}$ UFC. Les échantillons de fèces de rats axéniques ont été supplémentés simultanément avec les 4 espèces bactériennes cibles (3 séries, 3 concentrations (de 7.21 à 10.24 $\log_{10}$ UFC/g) /série, 3 répétitions/concentration). L'ADN fécal des échantillons supplémentés (200 mg) a été extrait selon le protocole de Furet et ses collaborateurs (2009) puis les concentrations bactériennes ont été mesurées par qPCR [207]. Les mesures recueillies ont été utilisées pour calculer un intervalle de tolérance dans lequel la proportion β (95%) de futurs résultats obtenus en appliquant la méthode sera trouvée. Cet intervalle a été ensuite comparé à un intervalle d'acceptabilité fixé à 0.5 log. La méthode de calcul est détaillée dans la norme XP U47 600-2:2011 « Méthodes d'analyse en santé animale - PCR (réaction de polymérisation en chaîne) - Part 2 : exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale ». Afin

d'illustrer la méthode, l'ADN d'échantillons de fèces de rats traités avec 10mg/kg de cefquinome a été extrait et analysé.

La méthode a été validée pour des plages de concentrations comprises entre 8.20-10.22 et 7.43–9.47 $\log_{10}$ UFC/g de fèces pour *B. fragilis* et *E. coli*, respectivement, avec des limites de quantification de 8.20 et 7.43 $\log_{10}$ UFC/g de fèces. En revanche, la méthode n'a pas été validée pour la quantification des bactéries *E. faecium* et *B. adolescentis*. Néanmoins, pour *E. faecium*, le profil d'exactitude a montré l'existence d'un biais constant sur la gamme étudiée et qui a pu être contrôlé en appliquant un facteur de correction de + 0.63 $\log_{10}$ UFC/g. Après correction, une ré-analyse des données montre que la méthode est valide dans l'intervalle d'acceptabilité défini. Cette correction sera prise en compte dans l'expression des résultats définitifs. Concernant *B. adolescentis*, le biais n'étant pas constant, un facteur de correction n'a pas pu être appliqué mais la technique peut être utilisée pour la détection de cette bactérie.

Le traitement à la cefquinome a entrainé une diminution significative ($p<0.05$) des concentrations en bifidobactéries (+ de 1 log), en entérocoques (1 log) et en *E.coli* (+ de 2 log) alors que le groupe *Bacteroides/Prevotella* n'est pas affecté par l'antibiotique.

MICROBIOLOGICAL METHODS

Use of Accuracy Profile Procedure to Validate a Real-Time PCR Method to Quantify Bacteria in Feces

MANUEL J. SAINT-CYR, AGNÈS PERRIN-GUYOMARD, and PAMÉLA HOUÉE
Anses, Fougères Laboratory, Antibiotics, Biocides, Residues and Resistance Unit, Fougères, France
MALEK V. VASSEUR
Anses, Fougères Laboratory, Antibiotics, Biocides, Residues and Resistance Unit, Fougères, France; INRA, UMR 1331, Toxalim, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Modelisation Team, Toulouse, France; Anses, Fougères Laboratory, Scientific Support Unit, Fougères, France
MICHEL LAURENTIE
Anses, Fougères Laboratory, Scientific Support Unit, Fougères, France

This study describes a novel validation procedure of real-time PCR based on accuracy profile to estimate bacterial concentrations in fecal samples. To assess the performance of the method, measurements of axenic fecal samples spiked with a measured quantity of known bacterial species (*Bacteroides fragilis, Bifidobacterium adolescentis, Enterococcus faecium,* and *Escherichia coli*) were performed under repeatability and intermediate precision conditions. Data collected were used to compute a tolerance interval that was compared to a defined acceptance interval. It is concluded that the method is valid and relevant for the studied validation range of 8.20–10.24 and 7.43–9.47 $\log_{10}$ CFU/g of feces to ensure proper measurement of *B. fragilis* and *E. coli*, respectively. The LOQ is 8.20 and 7.43 $\log_{10}$ CFU/g of feces. In contrast, the method is not valid for the quantification of *E. faecium* and *B. adolescentis*, but by applying a correction factor of +0.63 $\log_{10}$ CFU/g, it can be considered valid for *E. faecium*. This correction is included in the final results. In conclusion, the accuracy profile is a statistical tool that is easy to use and totally adapted to validate real-time PCR.

Several methods have been developed to numerate bacteria in biological and environmental samples; those for foodborne pathogens have been reviewed by Hoorfar (1). Sophisticated methods of molecular analysis of feces are being used to identify species and enumerate bacteria (2, 3). Molecular analysis can offer various advantages over cultural methods, including detection and enumeration of a wider range of uncultured microorganisms with greater sensitivity and specificity in environmental samples. However, feces consistency and components can make DNA extraction particularly difficult and the molecular analysis that follows, such as real-time PCR (qPCR), less efficient. Numerous DNA extraction methods, including commercial kits and homemade protocols, have been developed and used to determine bacterial population levels in several studies (4–7). However, only a few publications have fully demonstrated the effectiveness of their methods through robust validation experiments (8). Most studies have evaluated the performance of quantification methods using samples spiked with nonrepresentative bacteria from the targeted bacterial groups or by testing only one bacterial concentration (9, 10).

Received September 17, 2013. Accepted by AH November 13, 2013.
Corresponding author's e-mail: manuel.saint-cyr@anses.fr
DOI: 10.5740/jaoacint.13-310

The MIQE guidelines propose Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) to ensure the relevance, accuracy, correct interpretation, and repeatability of the experiment (11). Although the MIQE guidelines offer technical support, there is a lack of complete validation experiments. In fact, real-time PCR is a quantification method; therefore, a validation process is required to decide whether the method is valid or not by calculating performance characteristics such as trueness, precision, recovery, range of application, LOD, LOQ, specificity, and selectivity (12). In addition, the goal of an analytical method is to fit-for-purpose, i.e., produce results that reflect the contents of samples with acceptable accuracy. This accuracy needs to assess trueness and precision simultaneously, i.e., to measure the total error that is used to determine the accuracy profile (13, 14). Therefore, the accuracy profile is a possible decision-making graphical tool to decide whether an experimental procedure is valid, and its use has been widely discussed for physicochemical methods in previous published works (12, 15, 16). In 2009, Feinberg et al. (17) used this approach to validate an alternative method for counting bacteria. It was also recommended in French standard XP-U47-600-2 (18).

Here, we present a novel approach that allows a statistical validation of real-time PCR experiments. This validation procedure uses the accuracy profile applied to the quantification of bacterial concentrations in fecal samples by real-time PCR. The method includes DNA extraction from feces and the amplification of target Gram-negative and Gram-positive bacterial species.

Materials and Methods

Bacterial Strains and Growth Conditions

Bacterial type strains were obtained from the Biological Resource Center of the Institut Pasteur (CRBIP, Paris, France) and are presented in Table 1.

All strains were inoculated into tryptic soy broth and thioglycollate broth with resazurine for aerobic and anaerobic bacteria, respectively. Pure cultures were incubated at 37°C in an aerobic or anaerobic atmosphere (10% H_2, 10% CO_2, 80% N_2) for 24–48 h. The total number of CFUs of each culture,

Table 1. Type strains, oligonucleotide primers and probes used in this assay

Target organism[a]	Type strain	Primer and probe	Sequence 5′ - 3′	References
Bact-Prev	*Bacteroides fragilis* CIP 77.16	F_Bacter 11	CCTWCGATG GAT AGGGGT T	(9)
		F_Bacter 08	CAC GCTACTTGGCTGGTT CAG	
		P_Bac303	VIC-AAGGTC CCC CAC ATT G	
Bifid	*Bifidobacterium adolescentis* CIP 64.59	F_Bifid 09c	CGGGTGAGTAATGCGTGA CC	(9)
		R_Bifid 06	TGA TAG GACGCGACCCCA	
		P_Bifid	6FAM-CTC CTGGAAACGGGT G	
Entero	*Enterococcus faecium* CIP 103014	F_Entero	CCC TTATTGTTAGTTGCCATC ATT	(30)
		R_Entero	ACT CGTTGT ACT TCC CAT TGT	
E. coli	*Escherichia coli* CIP 54.8	E.coli F	CAT GCCGCGTGTATGAAG AA	(31)
		E.coli R	CGGGTAACGTCAATGAGCAAA	

[a] *Bact-Prev* = *Bacteroides-Prevotella* group; *Bifid* = Genus *Bifidobacterium*; *Entero* = Genus *Enterococcus*; *E. coli* = *Escherichia coli*.

was determined by plating 100 µL of the appropriate 10-fold dilution series on trypticase soy agar with 10% sheep blood, and on Schaedler agar with vitamin K_1 and 5% sheep blood (BD Diagnostic Systems, Le Pont de Claix, France) for aerobic and anaerobic bacteria, respectively.

Fecal Samples

All animal procedures were carried out in strict accordance with the recommendations of the French Ministry of Agriculture. The protocol was approved by Anses's Committee for Ethical Standards and performed in our approved animal breeding facility (Permit No. D35-137-26).

Fecal samples were obtained from rats (Charles River, Saint Germain sur l'Arbresle, France) housed in a sterile isolator. Within 2 h after collection, samples were stored at –80°C until further analysis.

DNA Extractions

Genomic DNA from fresh bacterial cultures at exponential phase was extracted using Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Charbonnières Les Bains, France) according to the manufacturer's instructions. Extracted DNA was quantified using the BioSpec-nano spectrophotometer (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD).

Fecal DNA was extracted from 0.2 g of fecal material using the G'NOME® kit (BIO 101, La Jolla, CA) with modifications as provided by Furet et al. (9). Briefly, fecal samples were homogenized in 480 µL of the supplied cell suspension solution. A 100 µL amount of cell lysis/denaturing solution (G'NOME kit) and 50 µL of RNase mix (G'NOME kit) were then added, and the samples were incubated at 55°C for 30 min with shaking at 900 rpm. A 25 µL amount of protease mix (G'NOME kit) was added to the RNase-treated samples, which were then incubated at 55°C for 2 h with shaking at 900 rpm. To improve cellular lysis, 750 µL of 0.1 mm diameter zirconia/silica beads (Biospec, Bartlesville, CA) was added, and agitation was carried out at maximum speed for 10 min in a Bead-Beater MM200 (Retsch, Haan, Germany). Polyvinylpolypyrrolidone (15 mg) (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was added to ensure removal of polyphenol contamination that could inhibit subsequent qPCR reactions.

Samples were vortexed and centrifuged at 20 000 *g* for

Table 2. Results (log_{10} CFU/g) of the validation experiment

						β-ETI[a]	
Bacteria	Reference concn	Avg. recovered concn	Bias	Intermediate precision (s_{IP})	Repeatability (s_r)	Lower limit	Upper limit
E. coli	7.43	7.42	–0.01	0.20	0.14	–0.41	0.39
	8.45	8.42	–0.02	0.19	0.11	–0.40	0.35
	9.47	9.23	–0.24	0.12	0.12	–0.47	0.00
B. fragilis	8.20	8.40	0.20	0.13	0.09	–0.06	0.47
	9.21	9.28	0.07	0.15	0.13	–0.23	0.36
	10.24	10.11	–0.13	0.12	0.10	–0.36	0.10
B. adolescentis	8.18	7.80	–0.38	0.24	0.24	–0.86	0.10
	9.19	8.75	–0.44	0.31	0.20	–1.07	0.18
	10.22	9.45	–0.77	0.28	0.08	–1.33	–0.20
E. faecium	7.21	6.63	–0.58	0.19	0.19	–0.96	–0.20
	8.22	7.60	–0.62	0.21	0.14	–1.04	–0.20
	9.25	8.55	–0.70	0.11	0.10	–0.91	–0.48

[a] β-ETI = β expectation tolerance interval.

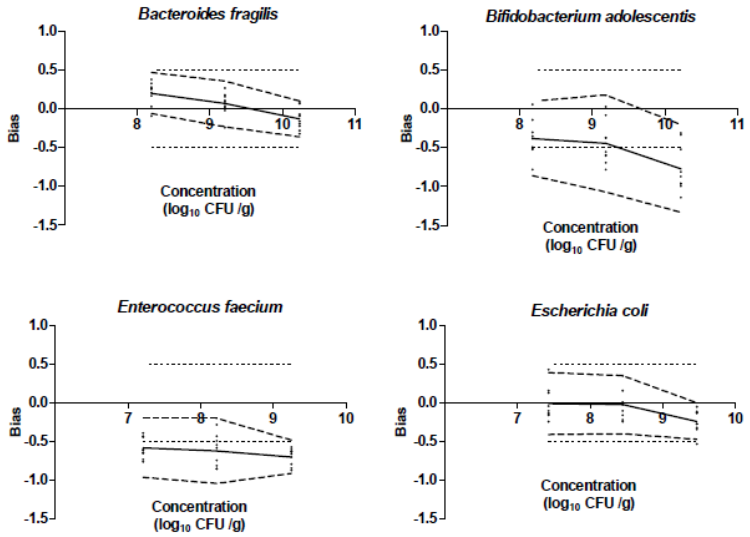


Figure 1. Accuracy profiles of the qPCR for *B. fragilis*, *B. adolescentis*, *E. faecium*, and *E. coli* for β = 95% and λ = 0.5 $\log_{10}$ CFU/g. The black line represents the bias of the method; dashed lines are the tolerance limits that define the 95% tolerance interval around the bias, i.e., the precision of the method; black points are raw data; dotted lines are the acceptance limits that show the validation area.

3 min, and the supernatant was recovered in a clean 2 mL microcentrifuge tube. The remaining pellet was washed with 400 µL TENP (50 mM Tris, pH 8; 20 mM EDTA, pH 8; 100 mM NaCl; 1% polyvinylpolypyrrolidone) and centrifuged at 20 000 *g* for 3 min. The washing step was repeated twice more, and the resulting supernatants were pooled (1.5 mL). Half of the supernatant (750 µL) was precipitated by addition of 1 mL of ice-cold isopropanol, then stored at −20°C for 10 min and centrifuged at 20 000 *g* for 10 min. The tube was drained on clean absorbent paper, and the pellet was resuspended in 400 µL of ultrapure water plus 100 µL of salt-out mixture (G'NOME kit) and incubated at 4°C for 10 min. Samples were spun for 10 min at maximum speed, and the supernatant containing the DNA was transferred to a clean 2 mL microcentrifuge tube. DNA was precipitated with 1.5 mL of ice-cold 100% ethanol at room temperature for 5 min followed by centrifugation at 20 000 *g* for 5 min. The DNA pellet was washed with 1 mL of room temperature 70% ethanol. After the pellet was air-dried, the DNA was resuspended in 150 µL of Tris EDTA buffer. The extracted DNA was stored at −20°C until analysis.

Oligonucleotide Primers and Probes

Primers and probes used in this study are presented in Table 1. TaqMan qPCR was adapted to quantify the *Bacteroides-Prevotella* group and the genus *Bifidobacterium*. Real-time qPCR using SYBR® Green was performed for *E. coli* and the genus *Enterococcus*. Primer and probe specificities were previously assessed by Furet et al. (9). The TaqMan probes were synthesized by Life Technologies (Saint Aubin, France). The primers were purchased from Sigma Aldrich.

Real-Time PCR Conditions

PCR was performed in 25 µL PCR volumes containing 15 µL Power SYBR Green PCR Master Mix 2X (Life Technologies) or TaqMan Universal PCR 2 (Life Technologies), 0.20 µM of each primer, 0.25 µM of each probe, and 10 µL of template DNA at the appropriate dilution i.e., to fall within the range covered by the calibration curve and avoid inhibition. Natural Multiplate Low-Profile 96-Well Unskirted PCR Plates and a Chromo4 LightCycler were used (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France). The cycling program included a 10 min incubation at 95°C followed by 40 cycles consisting of 95°C for 30 s, and 60°C for 1 min. For SYBR-Green amplifications, to improve amplification specificity, a melting curve analysis of the PCR products was performed by ramping the temperature to 95°C for 10 s and back to 50°C for 15 s followed by incremental increases of 0.5°C s^{-1} up to 95°C. The cycle threshold (Ct), i.e., the number of PCR cycles necessary to reach the threshold fluorescence level, was manually determined for each run by the user. All samples were analyzed in duplicate.

PCR Setup Controls

Multiple Non Template Controls (NTC) were included in every assay, and amplification of all NTC wells invalidated the entire qPCR run, leading to a repeat run.

Design of Validation Experiment

Calibration standards.—Genomic DNA from the different pure cultures was used to prepare 10-fold dilution series from 0.1 $\log_{10}$ to 8 $\log_{10}$ CFU equivalent. Sterile water (15 µL) was used as a negative control. A standard curve for each type strain was generated by plotting the Ct against the logarithm of bacterial quantity ($\log_{10}$ CFU equivalent).

Validation standards.—To validate the method, several fecal samples from germ-free rats were spiked with a measured quantity of known bacterial species. Briefly, pure cultures of type strains were used to spike 200 mg of bacteria-free fecal samples in triplicate at three different concentration levels, ranging from 7.21 to 10.24 $\log_{10}$ CFU equivalent/g of fresh feces corresponding to amounts ranging from 6.51 to 9.54 $\log_{10}$ CFU equivalent, in three

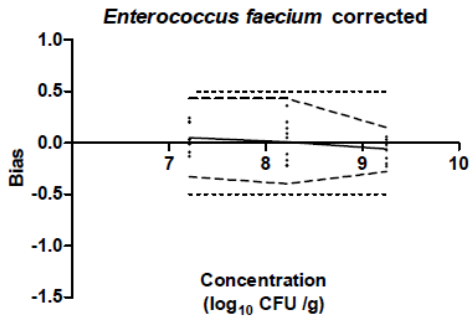


Figure 2. Corrected accuracy profile for *E. faecium* after subtracting the additive bias. The black line represents the bias of the method; dashed lines are the tolerance limits that define the 95% tolerance interval around the bias, i.e., the precision of the method, black points are raw data; dotted lines are the acceptance limits that show the validation area.

independent experiments. As a negative control, axenic feces were spiked with sterile water. To mimic the experimental design, the feces were mixed with the four bacteria simultaneously, and the spiked samples were stored at –80°C until extraction and real-time PCR analysis.

Total DNA of 27 spiked fecal samples and three negative controls were extracted as described above. Then, the resulting levels of the different bacteria were assessed by real-time qPCR using species-specific 16S rRNA gene primers (Table 1). The number of bacteria cells was determined by plotting the Ct obtained against the standard curve. For the highest concentrations expected to fall outside the range covered by the standard curve, an appropriate dilution was applied.

Validation samples.—To illustrate the quantification method, samples from a pilot study on the effect of a fourth-generation cephalosporin on different types of fecal bacteria were used. Briefly, four germ-free male rats, housed individually in a sterile isolator, were inoculated with fresh fecal swine flora. After implantation and stabilization, the rats received a single dose of subcutaneous cefquinome treatment (Cobactan; Intervet, Beaucouze, France) at 10 mg/kg for 4 days from Day 0 to Day 4 following fecal sampling. Fecal samples were collected before the treatment (Day 0), during the treatment at Days 1, 2, 3, and 5 after the end of treatment. Microbiota evolution was measured by qPCR, as described above.

Accuracy Profile Procedure

The accuracy profile, represented by a two-sided β expectation tolerance interval (β-ETI), was calculated for each concentration level from the results of the validation experiments. We defined the acceptability limits (λ) at ±0.5 $\log_{10}$ unit in accordance with the French standard (17, 18). The risk was set at 5% supporting that 95% (β) of future measurements would fall within the acceptability limits.

The complete theory and calculation of accuracy profiles are described in references 13, 14, and 19, and a fully developed application is presented for microbiological methods in references 17 and 20. The procedure reported here is simplified and adapted to molecular methods; the different data obtained were analyzed with a Microsoft Excel worksheet based on French standard XP U47-600-2 (18). The calculation procedure can be summarized as the following sequence of operations: Define the acceptability limits for the method. Collect $\log_{10}$ CFU equivalent/g of fresh feces obtained. For each concentration level, calculate the intermediate precision (s_{IP}) using Equation 1:

$$s_{IP} = \sqrt{s_B^2 + s_r^2} \quad (1)$$

where s_r^2 represents the within-series variance (repeatability variance) and s_B^2 the between-series variance. For each level, compute $\bar{\bar{x}}$ the average of measurements (recovered concentrations) and calculate the absolute bias according to Equation 2:

$$\bar{\bar{x}} - T \quad (2)$$

where T is the reference concentration at each level. For each level, calculate the limits of the β-ETI according to Equation 3:

$$\bar{\bar{x}} \pm k_M \times s_{IP} \quad (3)$$

where k_M represents a coverage factor established at 2 in the French standard XP U47-600-2 (18). For each level, compute the difference between the β-ETI limits and the reference concentration T according to Equation 4:

$$[\bar{\bar{x}} \mp k_M \times s_{IP}] - T \quad (4)$$

Generate a graphical representation of calculated results as

Table 3. Quantification of dominant and subdominant bacteria in fecal microbiota[a]

	Experimental period, in days (d)				
	Treatment				Post
Bacterial groups	d0	d1	d2	d3	d5
Bact-Prev	10.3 ± 0.23	10.3 ± 0.07	10.2 ± 0.23	10.2 ± 0.15	10.2 ± 0.24
Bifid	<LOQ[(a)]	<LOD[(b)]	<LOD[(b)]	<LOD[(b)]	<LOQ[(a)]
Entero	10.0 ± 0.76	9.2 ± 0.42	8.9 ± 0.61*	8.7 ± 0.26*	9.0 ± 0.43
E. coli	8.8 ± 0.36	<LOQ[(c)]	<LOQ[(c)]	<LOQ[(c)]	8.6 ± 0.43

[a] Results obtained by qPCR were expressed as the mean of the $\log_{10}$ value (n = 4) ± SD of $\log_{10}$ CFU/g; *Bact-Prev* = *Bacteroides-Prevotella* group; *Bifid* = Genus *Bifidobacterium*; *Entero* = Genus *Enterococcus*; *E. coli* = *Escherichia coli*; (a) *Bifidobacterium* LOQ = 8.18 $\log_{10}$ CFU/g; (b) LOD = 5 $\log_{10}$ CFU/g; (c) *E. coli* LOQ = 7.43 $\log_{10}$ CFU/g; * indicates a significant difference at $P < 0.05$ in comparison to d0.

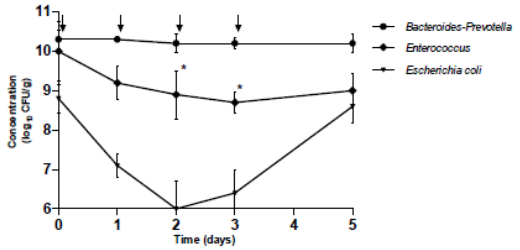


Figure 3. Time course evolution of gut microbiota during cefquinome treatment. Arrows indicate cefquinome administration; asterisk indicates a significant difference at $P < 0.05$ in comparison to d0.

follows: on the horizontal (x) axis, plot the reference concentrations T in $\log_{10}$ CFU/g. On the vertical (y) axis, simultaneously plot at each level the bias (Equation 2), the acceptability limits (λ), and the limits of the β-ETI (Equation 4), all expressed in in $\log_{10}$ CFU/g.

Statistical Analysis of the Pilot Study

The data are presented as the $\log_{10}$ CFU equivalent/g of fresh feces ($\log_{10}$ CFU/g). Statistical analysis was performed with SYSTAT V.13 (Systat Software, Chicago, IL). Bacterial levels were compared using analysis of variance, followed by Dunnett's Multiple Comparison test to compare each sampling time during and after the treatment to the sampling time before the treatment (control). P values <0.05 were considered statistically significant.

Results and Discussion

This validation study is the first application of an accuracy profile to qPCR for the quantification of four bacterial species from intestinal microbiota.

Validation Experiment

Table 2 shows the main performance parameters such as average recovered concentrations, repeatability, intermediate precision, absolute bias, and the tolerance intervals for each target bacteria. In Table 2, trueness is represented by the absolute bias, and precision is symbolized by the lower and upper tolerance limits (β-ETI) calculated with intermediate precision including repeatability.

Generally, bias showed great variability depending on the bacterial species and concentration levels. For *E. coli* and *B. fragilis*, biases ranged from –0.01 to –0.24 and –0.13 to 0.20 $\log_{10}$ CFU/g, respectively. In contrast, the biases for *E. faecium* and *B. adolescentis* were higher, ranging from –0.58 to –0.70 and –0.77 to –0.38 $\log_{10}$ CFU/g, respectively. These results indicated that the trueness of the method for *E. faecium* and *B. adolescentis* did not satisfy the acceptability criteria conditions of ±0.5 $\log_{10}$ CFU/g. The tolerance interval values were largely above the ±0.5 $\log_{10}$ CFU/g acceptability limits for *B. adolescentis* and *E. faecium*.

Accuracy Profiles

In this study, we assessed the performance of a quantification method using the accuracy profile procedure in the scope of molecular biology. Several papers describe the mathematical relation for standard curves, but they do not assess the performance of the method in terms of bias and precision (21–24). The accuracy profile enables characterization of variability under defined conditions. In our study, measurements were performed under repeatability and intermediate precision conditions and were then used to compute a tolerance interval, i.e., an interval within which 95% of future measurements will be expected to fall. When the accuracy profile interval was compared to an acceptability interval defined by the acceptability limits, it was possible to draw conclusions about the validity of the method (18). This issue is in line with the current revision work of the standard ISO 16140:2003 (25), which strives to include acceptability criteria for the analytical performance characteristics as reviewed by Lombard and Leclercq (26).

From the data in Table 2, the average recovered concentrations and the tolerance intervals were used to compute the four accuracy profiles that are shown in Figure 1. When considering the profiles for the quantification of *E. coli* and *B. fragilis*, the tolerance intervals were within the acceptability limits of ±0.5 $\log_{10}$ CFU/g. It can therefore be concluded that the method is valid and relevant for the studied validation range of 8.20–10.24 and 7.43–9.47 $\log_{10}$ CFU/g to ensure proper measurement of *B. fragilis* and *E. coli*, respectively. In this case, the LOQ was equal to the lowest limit of the validation domain, i.e., 8.20 and 7.43 $\log_{10}$ CFU/g.

In contrast, for *E. faecium* and *B. adolescentis*, a part of the tolerance intervals is excluded from the acceptability limits, as demonstrated in Figure 1. Consequently, the method is not valid for the quantification of these bacteria. However, for *E. faecium*, the absolute bias is excluded from the acceptability limits but is constant throughout the range level. This type of accuracy profile was also described for analytical methods in chemistry and was analyzed in the usual manner using a correction factor (16, 19). In fact, error is mainly linked to a systematic error which was assessed and determined on accuracy profile. In our case, the correction factor was estimated at +0.63 $\log_{10}$ CFU/g, corresponding to a mean value of the bias. All concentrations were adjusted, and the accuracy profile was recalculated and is shown in Figure 2. It was clearly demonstrated that after correction, the bias was close to zero and the tolerance intervals were within the acceptability limits. Consequently, the method can also be considered valid for *E. faecium*, and the correction will be taken into account in the expression of the final results.

On the other hand, correction could not be used for *B. adolescentis* because the bias was not constant and the precision was highly variable throughout the range of tested concentrations. Although the method was not valid for quantification, it could be used for detection of the genus *Bifidobacterium*.

In conclusion, we validated the method for three of the four target bacteria, i.e., *B. fragilis, E. coli*, and *E. faecium*, by using the accuracy profile. Knowledge of the accuracy ensures that 95% of future measurements will be in the validated interval concentration. For Gram-positive bacteria *E. faecium* and *B. adolescentis,* the bias observed could be assumed to the cell wall difference in extraction efficiency. Previous studies have shown that observed microbial composition is mainly affected by the efficiency of cell lysis (5, 6, 27). However, for *E. faecium*, the

accuracy profile allows correct estimate of the true concentration of this bacterium by applying a correction factor.

Time Course Evolution of Gut Microbiota During Cefquinome Treatment

To illustrate the quantification method, we investigated the effect of an antibiotic treatment on the intestinal microbiota balance by assessing the time course evolution of fecal bacterial populations using qPCR. Table 3 and Figure 3 illustrate the results obtained with four target bacterial groups. In our study, cefquinome showed a broad spectrum of activity typical for fourth-generation cephalosporins.

The high in vivo activity of cefquinome against the genus *Bifidobacterium* was supported by the absence of detection during the treatment period (28). Bifidobacteria were detected before and after the treatment, while during cefquinome administration from Day 1 to Day 3, *Bifidobacterium* levels dropped below the LOD (5 $\log_{10}$ CFU/g).

The *Bacteroides-Prevotella* group levels were not significantly different ($P > 0.05$) and remained stable during the antibiotic treatment at an average level of 10.2 $\log_{10}$ CFU/g. We can conclude that cefquinome had no effect on the *Bacteroides-Prevotella* group, as was shown by Limbert et al. (28), who found that 11 of the 14 tested strains were resistant to cefquinome at an in vitro concentration higher than 100 µg/mL (28).

Cefquinome demonstrated moderate activity on the genus *Enterococcus*. These results are supported by a significant decrease of concentration observed from Day 2 to Day 3 ($P < 0.05$), as described in an earlier survey (13).

The concentrations of *E. coli* in feces drastically decreased by 2 $\log_{10}$ below the LOQ from Day 1 to Day 3 of the treatment. After the end of treatment (Day 5), the concentration of *E. coli* increased to above the LOQ and returned to a basal level of 8.6 $\log_{10}$ CFU/g. Considering that the values obtained were below the LOQ, the data cannot be statistically analyzed. However, the observations highlighted that *E. coli* was strongly affected by cefquinome treatment as previously described (29).

Conclusions

The accuracy profile is easy to use and fully suited to validation of real-time PCR in a range of concentrations and for any type of ecosystem sample (soil, feces). In addition, the use of accuracy profile could be extended to other molecular methods dealing with bacteria quantification, but some adjustments could be required such as acceptability limits and fit-for-purpose.

The method was validated for both DNA extraction and molecular quantification with fecal target bacteria and therefore can be recommended for all studies dealing with the quantification of bacteria in feces. Based on this, we are confident that the use of the accuracy profile for the validation procedure allowed us to highlight changes in intestinal microbiota.

Acknowledgments

We thank Jacqueline Manceau for validation support, and Jean-Guy Rolland, Fougéres Laboratory, Scientific Support Unit, Fougéres, France, for technical support.

References

(1) Hoorfar, J. (2011) *APMIS* **119**, 1–24. http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2011.02767.x

(2) Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., & Relman, D.A. (2005) *Science* **308**, 1635–1638. http://dx.doi.org/10.1126/science.1110591

(3) Zwielehner, J., Lassl, C., Hippe, B., Pointner, A., Switzeny, O.J., Remely, M., Kitzweger, E., Ruckser, R., & Haslberger, A.G. (2011) *PLoS ONE* **6**, e28654. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028654

(4) McOrist, A.L., Jackson, M., & Bird, A.R. (2002) *J. Microbiol. Methods* **50**, 131–139. http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00018-0

(5) Salonen, A., Nikkilä, J., Jalanka-Tuovinen, J., Immonen, O., Rajilic-Stojanovic, M., Kekkonen, R.A., Palva, A., & de Vos, W.M. (2010) *J. Microbiol. Methods* **81**, 127–134. http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.007

(6) Yuan, S., Cohen, D.B., Ravel, J., Abdo, Z., & Forney, L.J. (2012) *PLoS ONE* **7**, e33865. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033865

(7) Tang, J.N., Zeng, Z.G., Wang, H.N., Yang, T., Zhang, P.J., Li, Y.L., Zhang, A.Y., Fan, W.Q., Zhang, Y., Yang, X., Zhao, S.J., Tian, G.B., & Zou, L.K. (2008) *J. Microbiol. Methods* **75**, 432–436. http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2008.07.014

(8) Leblanc-Maridor, M., Garénaux, A., Beaudeau, F., Chidaine, B., Seegers, H., Denis, M., & Belloc, C. (2011) *J. Microbiol. Methods* **85**, 53–61. http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.013

(9) Furet, J.-P., Firmesse, O., Gourmelon, M., Bridonneau, C., Tap, J., Mondot, S., Doré, J., & Corthier, G. (2009) *FEMS Microbiol. Ecol.* **68**, 351–362. http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00671.x

(10) Wang, I.K., Lai, H.C., Yu, C.J., Liang, C.C., Chang, C.T., Kuo, H.L., Yang, Y.F., Lin, C.C., Lin, H.H., Liu, Y.L., Chang, Y.C., Wu, Y.Y., Chen, C.H., Li, C.Y., Chuang, F.R., Huang, C.C., Lin, C.H., & Lin, H.C. (2012) *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1107–1112. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.05605-11

(11) Bustin, S., Beaulieu, J.-F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F., Olsvik, P., Penning, L., & Toegel, S. (2010) *BMC Molecular Biology* **11**, 74. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2199-11-74

(12) Feinberg, M. (2007) *J. Chromatogr. A* **1158**, 174–183. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.021

(13) Hubert, P., Nguyen-Huu, J.J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Chiap, P., Cohen, N., Compagnon, P.A., Dewé, W., Feinberg, M., Lallier, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Nivet, C., Valat, L., & Rozet, E. (2007) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45**, 70–81. http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2007.06.013

(14) Hubert, P., Nguyen-Huu, J.J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Cohen, N., Compagnon, P.A., Dewé, W., Feinberg, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Valat, L., & Rozet, E. (2007) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45**, 82–96. http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2007.06.032

(15) Chéneau, E., Henri, J., Pirotais, Y., Abjean, J.-P., Roudaut, B., Sanders, P., & Laurentie, M. (2007) *J. Chromatogr. B* **850**, 15–23. http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.10.072

(16) Feinberg, M., San-Redon, J., & Assié, A. (2009) *J. Chromatogr. B* **877**, 2388–2395. http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.10.004

(17) Feinberg, M., Sohier, D., & David, J.-F. (2009) *J. AOAC Int.* **92**, 527–537

(18) AFNOR XP U47-600-2:2011 (2011) *Animal Health Analysis Methods–PCR—Part 2: Requirements and Recommendations for the Development and the Validation of Veterinary PCR*, Cedex, France

(19) Hubert, P., Nguyen-Huu, J.J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Cohen, N., Compagnon, P.A., Dewé, W., Feinberg, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Valat, L., & Rozet, E. (2008) *J.*

Pharm. Biomed. Anal. **48**, 760–771. http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2008.07.018

(20) Boubetra, A., Le Nestour, F., Allaert, C., & Feinberg, M. (2011) *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 3360–3367. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00020-11

(21) Bar, T., Kubista, M., & Tichopad, A. (2012) *Nucleic Acids Res.* **40**, 1395–1406. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr778

(22) Chandelier, A., Ivors, K., Garbelotto, M., Zini, J., Laurent, F., & Cavelier, M. (2006) *Validation of a Real-Time PCR Method for the Detection of Phytophthora ramorum*, Blackwell, Oxford, ROYAUME-UNI

(23) Liu, W., & Saint, D.A. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**, 347–353. http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00478-3

(24) Rutledge, R.G., & Côté, C. (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**, e93. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gng093

(25) ISO 16140:2003 (2003) *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Protocol for the Validation of Alternative Methods*, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland

(26) Lombard, B., & Leclercq, A. (2011) *Food Anal. Meth.* **4**, 163–172. http://dx.doi.org/10.1007/s12161-010-9154-4

(27) Scupham, A.J., Jones, J.A., & Wesley, I.V. (2007) *J. Appl. Microbiol.* **102**, 401–409. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03094.x

(28) Limbert, M., Isert, D., Klesel, N., Markus, A., Seeger, K., Seibert, G., & Schrinner, E. (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 14–19. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.35.1.14

(29) Thomas, E., Thomas, V., & Wilhelm, C. (2006) *Vet. Microbiol.* **115**, 140–147. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.12.019

(30) Rinttilä, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogius, L., & Palva, A. (2004) *J. Appl. Microbiol.* **97**, 1166–1177. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02409.x

(31) Huijsdens, X.W., Linskens, R.K., Mak, M., Meuwissen, S.G.M., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., & Savelkoul, P.H.M. (2002) *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4423–4427. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.12.4423-4427.2002

Conclusions/Importance

En conclusion, l'utilisation du profil d'exactitude nous a permis de valider la méthode de quantification par PCR en temps réel de 3 des 4 bactéries ciblées dans notre étude, à savoir, *B. fragilis*, *E. coli* et *E. faecium*. Le profil d'exactitude est un outil statistique performant et totalement adapté pour valider une méthode de quantification de bactéries présentes à des concentrations variables dans la matrice fécale.

Cette approche montre que la qPCR peut être utilisée pour mesurer de façon fiable, l'évolution des concentrations bactériennes dans le microbiote intestinal suite à l'ingestion d'un contaminant alimentaire. Cette méthode analytique de quantification peut donc être utilisée pour étudier l'impact du DON sur le microbiote intestinal humain.

ARTICLE 3

Évaluation d'une exposition orale subchronique de déoxynivalénol sur la composition du microbiote intestinal humain chez un modèle de rats à flore humanisée.

Manuel J. Saint-Cyr, Agnès Perrin-Guyomard, Paméla Houée, Jean-Guy Rolland, Michel Laurentie.

PLOS ONE

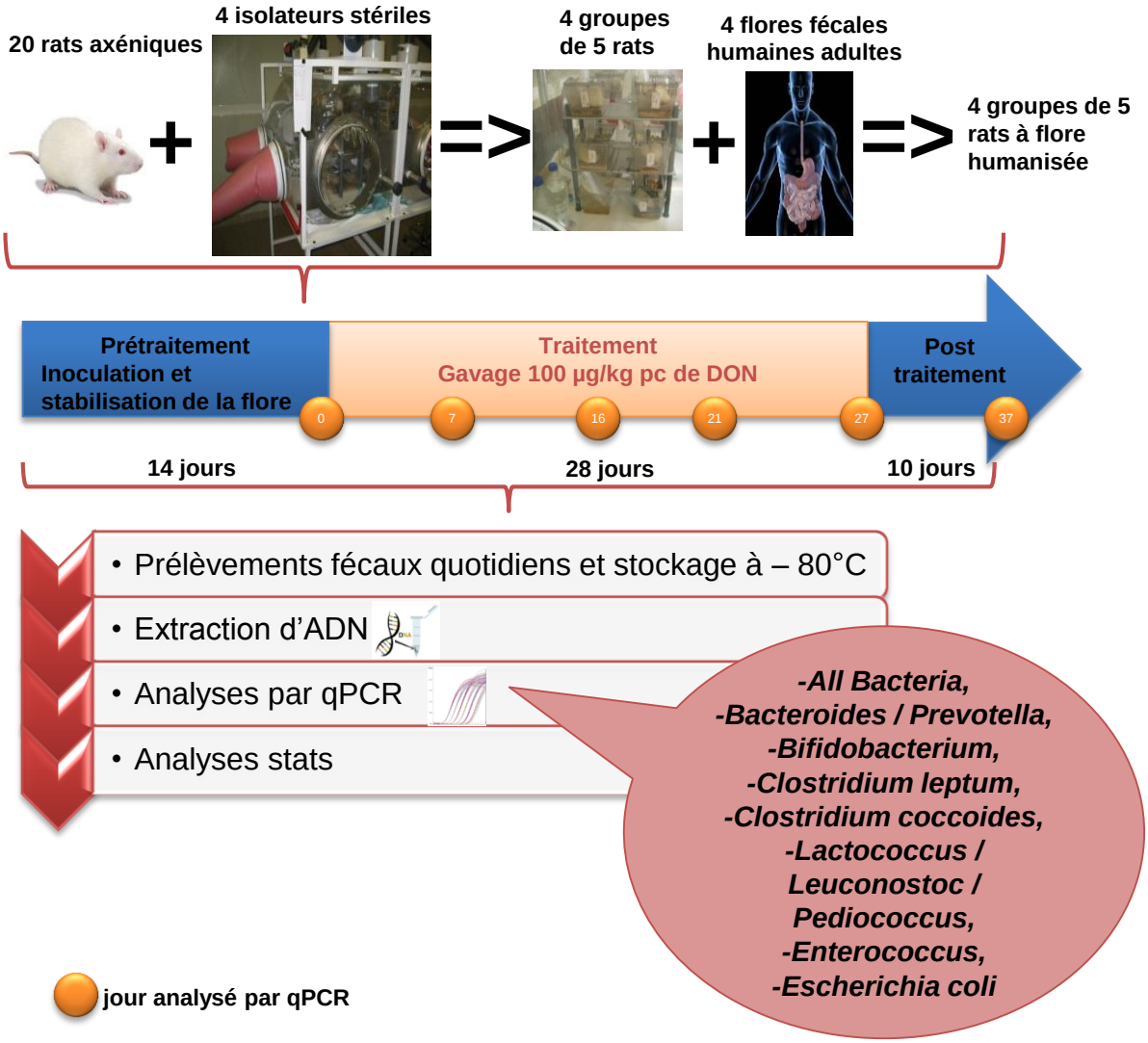


Figure 22 : Protocole expérimental réalisé pour l'étude d'impact du DON sur le microbiote intestinal.

Contexte

Le déoxynivalénol (DON) est l'une des mycotoxines les plus répandues dans les cultures céréalières du monde entier. En raison de ses propriétés toxiques, sa grande stabilité et sa prévalence, la présence de DON dans la chaîne alimentaire représente un risque sanitaire pour l'Homme et les animaux. Le microbiote intestinal humain (MIH) est potentiellement le premier organe cible de ce contaminant alimentaire. Hors, actuellement, aucune donnée sur les effets du DON au niveau du microbiote intestinal humain ne sont disponibles. Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle de rats à flore humanisée pour évaluer l'impact d'une exposition sub-chronique de DON sur la composition du MIH.

Méthodologie / Principaux résultats

Quatre groupes de 5 rats mâles axéniques, hébergés dans 4 isolateurs stériles, ont été inoculés avec une flore fécale humaine différente (figure 22). Après 2 semaines de stabilisation de la flore, les rats ont reçu quotidiennement par gavage une solution de DON à 100 µg/kg de poids corporel (dose toxicologique sans effet) pendant 4 semaines. Des échantillons fécaux ont été prélevés au jour 0 avant le début du traitement, aux jours 7, 16, 21, et 27 pendant le traitement et, 10 jours après la fin du traitement. L'ADN fécal des échantillons prélevés a été extrait selon le protocole de Furet et al. puis l'effet du DON sur les groupes bactériens dominants et sous-dominants de la flore fécale a été quantifié par PCR en temps réel.

Pour pallier à la variabilité des extractions d'ADN, une normalisation a été faite en soustrayant la concentration (log_{10} UFC/g) obtenue pour le groupe « *all bacteria* » à la concentration (log_{10} UFC/g) obtenue pour les autres groupes bactériens ciblés. Malgré un microbiote intestinal différent dans chaque isolateur, des tendances similaires ont été généralement observées dans les 4 groupes de rats. Pendant l'exposition au DON, une augmentation significative de 0,5 log_{10} a été observée pour le groupe *Bacteroides/Prevotella* pendant les 3 premières semaines d'administration. La concentration d'*Escherichia coli* a diminué au jour 27 (0,9 log_{10} UFC/g) sans revenir à son niveau initial après arrêt du traitement.

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Evaluation of an Oral Subchronic Exposure of Deoxynivalenol on the Composition of Human Gut Microbiota in a Model of Human Microbiota-Associated Rats

Manuel J. Saint-Cyr[1]*, Agnès Perrin-Guyomard[1], Paméla Houée[1], Jean-Guy Rolland[2], Michel Laurentie[2]

1 Anses, Fougères Laboratory, Antibiotics, Biocides, Residues and Resistance Unit, Fougères, France, **2** Anses, Fougères Laboratory, Scientific Support Unit, Fougères, France

Abstract

Background: Deoxynivalenol (DON), a mycotoxin produced by *Fusarium* species, is one of the most prevalent mycotoxins present in cereal crops worldwide. Due to its toxic properties, high stability and prevalence, the presence of DON in the food chain represents a health risk for both humans and animals. The gastrointestinal microbiota represents potentially the first target for these food contaminants. Thus, the effects of mycotoxins on the human gut microbiota is clearly an issue that needs to be addressed in further detail. Using a human microbiota-associated rat model, the aim of the present study was to evaluate the impact of a chronic exposure of DON on the composition of human gut microbiota.

Methodology/Principal Findings: Four groups of 5 germ free male rats each, housed in 4 sterile isolators, were inoculated with a different fresh human fecal flora. Rats were then fed daily by gavage with a solution of DON at 100 µg/kg bw for 4 weeks. Fecal samples were collected at day 0 before the beginning of the treatment; days 7, 16, 21, and 27 during the treatment; and 10 days after the end of the treatment at day 37. DON effect was assessed by real-time PCR quantification of dominant and subdominant bacterial groups in feces. Despite a different intestinal microbiota in each isolator, similar trends were generally observed. During oral DON exposure, a significant increase of 0.5 log10 was observed for the *Bacteroides/Prevotella* group during the first 3 weeks of administration. Concentration levels for *Escherichia coli* decreased at day 27. This significant decrease (0.9 log10 CFU/g) remained stable until the end of the experiment.

Conclusions/Significance: We have demonstrated an impact of oral DON exposure on the human gut microbiota composition. These findings can serve as a template for risk assessment studies of food contaminants on the human gut microbiota.

Citation: Saint-Cyr MJ, Perrin-Guyomard A, Houée P, Rolland J-G, Laurentie M (2013) Evaluation of an Oral Subchronic Exposure of Deoxynivalenol on the Composition of Human Gut Microbiota in a Model of Human Microbiota-Associated Rats. PLoS ONE 8(11): e80578. doi:10.1371/journal.pone.0080578

Editor: Yvette Tache, University of California, Los Angeles, United States of America

Received August 22, 2013; **Accepted** October 12, 2013; **Published** November 18, 2013

Copyright: © 2013 Saint-Cyr et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by the French agency for food, environmental and occupational health and safety (Anses). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: manuel.saint-cyr@anses.fr

Introduction

Deoxynivalenol (DON) is a mycotoxin of the trichothecene family which is a fungal secondary metabolite. Produced by the species *Fusarium*, it is one of the most prevalent mycotoxins present in cereal crops worldwide, and the most frequently occurring type B trichothecene in Europe. A large scale data survey indicated that DON is present in 57% of food samples collected in the European Union [1]. Moreover, the Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) estimates that European cereal consumers have an estimated intake of DON of 1.4 µg/kg body weight (bw) per day [2]. Exposure to DON could also be estimated using biomarkers. Assessment of mycotoxin and its metabolites in urine provide individual data that may establish the prevalence and range of global DON exposure. Therefore, Turner *et al*, have confirmed that French farmers and United Kingdom adults have been exposed to an almost ubiquitous amounts of DON [3–5]. Due to its toxic properties, high stability and prevalence, the presence of DON in the food chain represents an important threat to food safety and therefore represents a health risk for both humans and animals [6].

Epidemiological studies linking DON exposure to adverse health outcomes in humans have been reported in China, India, Japan and Korea [7–9]. Human gastroenteritis with nausea, diarrhea and vomiting are the main symptoms linked to *Fusarium*-contaminated foods. In addition to the symptoms described in humans, DON toxicity in animals is reflected by feed refusal and consequently growth retardation [10]. At the cellular level, DON has been shown to inhibit protein synthesis and to modulate immune responses [11]. Therefore, a No Observable Adverse Effect Level (NOAEL) has been established at 100 µg/kg of bw based on a decrease body weight gain reported in a 2-year feeding study in mice [12].

Risk assessment approaches to determine a NOAEL are based on physicochemical, pharmacological and toxicological studies. From a microbiological perspective, the ingestion of deoxynivalenol also poses a potential risk to human health since changes in the composition of the human gut microbiota may influence host functions after oral exposure to food contaminants. These changes could, for example, impair colonization resistance that protects the host against pathogen proliferation [13]. Some total diet studies have indicated that dietary exposure through the consumption of food contaminated by mycotoxins is frequent in many populations [14–18]. Furthermore, results from Wache *et al.* clearly demonstrated that low doses of DON, which can typically be found in livestock animal feedstuff, had an impact on the swine fecal flora [19]. Despite the fact that the intestine is the major site of DON absorption and the first target of these toxins [20], and the fact that the gastrointestinal tract and its microbiota represent the first barrier against food contaminants, studies describing the effect of DON on the intestinal microbiota are limited. In fact, several *in vitro* studies have identified intestinal and soil borne bacteria that promote metabolism, binding or detoxification of DON [21–28]. By contrast, limited data on the impact of DON or other members of the trichothecene family on intestinal microbiota have been published [19,29–32]. Data on the detrimental effects of DON on the human gut microbiota are very limited and therefore, the actual health risk from an oral contamination is unknown. Thus, the effects of mycotoxins on the human gut microbiota are clearly an issue that needs to be addressed in further detail.

Using an *in vivo* approach with a human microbiota-associated rat model (HMA rats), the aim of the present study was to evaluate the impact of a subchronic NOAEL dose exposure of DON on the composition of human gut microbiota. The effect of DON was assessed by monitoring changes in the gut microbiota by real-time PCR (qPCR) quantification of dominant and subdominant bacterial groups.

Materials and Methods

Animals

All animal procedures were carried out in strict accordance with the recommendations of the French Ministry of Agriculture. The protocol was approved by Anses's Committee for Ethical Standards and performed in our approved animal breeding facility (Permit Number: D35-137-26).

Axenic Male Sprague-Dawley rats were obtained from the breeding facility of Charles River laboratories (Saint Germain sur l'Arbresle, France). Sterile pelleted feed (SAFE, Scientific Animal Food and Engineering, Augy, France) free of mycotoxin-contamination and sterile water were provided *ad libitum*. The 20 rats (8 weeks old, 120–150 g bw) were housed individually in polycarbonate cages in 4 sterile isolators. Animals were acclimatized for one week.

Human donors

The procedure of feces sampling in humans does not require unusual and invasive procedures for monitoring and diagnostic, and consequently no ethical permission was mandatory according to the legislation applicable in France in the article of Act L. 1121-1 of 2012. The volunteers signed a consent form for sample utilization and data publication.

The fecal inocula were obtained from 4 healthy adult individuals. These volunteers consumed an unrestricted western-type diet and were not under antibiotic treatment or taking any other drugs known to influence the fecal microbiota composition for at least three months prior to sampling. All subjects were free of known metabolic or gastrointestinal diseases.

Study design

Transfer of human flora into germ-free rats. Four groups of 5 rats were inoculated with a different fresh human fecal flora. The human fecal specimens were collected and immediately placed in an anaerobic atmosphere (GasPak EZ Anaerobe, BD Diagnostic Systems). In the laboratory, samples were transferred to the Whitley A35 Anaerobic Workstation (AES CHEMUNEX, Bruz, France) for microbiological preparation. Fecal samples from the donors were diluted 1/99 (weight/volume) in prereduced Thioglycollate broth with Resazurine and then given orally to the rats in a volume of 1 ml per rat.

Treatment with deoxynivalenol. After allowing two weeks for microbiota stabilization, 100 µg/kg bw of DON was administrated daily by gavage to the 4 groups of rats for 4 weeks. Fecal samples were collected at day 0 before the beginning of the treatment; days 7, 16, 21, and 27 during the treatment; and 10 days after the end of the treatment at day 37. After collection, they were stored at −80°C and at −20°C until molecular and physicochemical analyses respectively.

Chemical reagents

Deoxynivalenol was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and dissolved in acetonitrile (Sigma-Aldrich) at 1 mg/ml. This solution was stored for a maximum of 1 year at −18°C. The working solutions were diluted in physiological saline solution (B. Braun Avitum, Gradignan, France), stored at room temperature and renewed weekly. Their stability was verified, prior to start the animal experiments, by dosing a working DON solution stored in isolator for 2 weeks. DON concentrations were assessed one time, each week, by an in-house developed and validated High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet detection (HPLC–UV) method.

Bacterial strains and growth

Bacterial type strains used for standard genomic DNA were obtained from the Biological Resource Center of the Institut Pasteur (CRBIP, Paris, France) or Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) and are presented in table 1.

All strains were inoculated into Tryptic Soy broth, MRS broth and Thioglycollate broth with Resazurine for aerobic, *Lactobacillus acidophilus* and other anaerobic bacteria respectively. Pure cultures were incubated at 37°C in an aerobic or anaerobic atmosphere (10% H2, 10% CO2, 80% N2). The total number of Colony Forming Units (CFU) of each culture was determined by plating 100 µl of the appropriate 10-fold dilution series on Trypticase Soy Agar with 10% Sheep Blood, on MRS Agar and on Schaedler Agar with Vitamin K1 and 5% Sheep Blood (BD Diagnostic Systems, Le Pont de Claix, France) for aerobic, *Lactobacillus acidophilus* and anaerobic bacteria respectively.

DNA extraction

Genomic DNA from bacterial cultures was extracted using Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Charbonnières Les Bains, France) according to the manufacturer's instructions. Extracted DNA was quantified using a BioSpec-nano (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, U.S.A.).

Fecal DNA was extracted from the 200 mg aliquots of feces as described previously [33].

Table 1. Target organisms, type strains, oligonucleotide primers and probes used in this assay.

Target organism	Type strain	Primer and probe	Sequence 5′ - 3′	References
All bacteria	*Escherichia coli* CIP 54.8	F_Bact 1369	CGGTGAATACGTTCCCGG	[33]
		R_Prok 1492	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	
		P_TM1389F	6FAM-CTTGTACACACCGCCCGTC	
Bacteroides/Prevotella group	*Bacteroides fragilis* CIP 77.16	F_Bacter 11	CCTWCGATGGATAGGGGTT	[33]
		F_Bacter 08	CACGCTACTTGGCTGGTTCAG	
		P_Bac303	VIC-AAGGTCCCCCACATTG	
Clostridium coccoides group	*Blautia coccoides* DSM-935	F_Ccoc 07	GACGCCGCGTGAAGGA	[33]
		R_Ccoc 14	AGCCCCAGCCTTTCACATC	
		P_Erec482	VIC-CGGTACCTGACTAAGAAG	
Clostridium leptum group	*Clostridium leptum* DSM-753	F_Clept 09	CCTTCCGTGCCGSAGTTA	[33]
		R_Clept 08	GAATTAAACCACATACTCCACTGCTT	
		P_Clep 01	6FAM-CACAATAAGTAATCCACC	
Genus *Bifidobacterium*	*Bifidobacterium adolescentis* CIP 64.59	F_Bifid 09c	CGGGTGAGTAATGCGTGACC	[33]
		R_Bifid 06	TGATAGGACGCGACCCCA	
		P_Bifid	6FAM-CTCCTGGAAACGGGTG	
Genus *Enterococcus*	*Enterococcus faecium* CIP 103014	F_Entero	CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT	[61]
		R_Entero	ACTCGTTGTACTTCCCATTGT	
Escherichia coli	*Escherichia coli* CIP 54.8	E.coli F	CATGCCGCGTGTATGAAGAA	[62]
		E.coli R	CGGGTAACGTCAATGAGCAAA	
Lactobacillus/Leuconostoc/ Pediococcus group	*Lactobacillus acidophilus* DSM-20079	F_Lacto 05	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	[33]
		R_Lacto 04	CGCCACTGGTGTTCYTCCATATA	

doi:10.1371/journal.pone.0080578.t001

Oligonucleotide primers and probes

Primers and probes used in this study are presented in table 1. TaqMan qPCR was adapted to quantify the *All bacteria* system, the *Bacteroides/Prevotella*, *Clostridium coccoides*, *Clostridium leptum* groups and the genus *Bifidobacterium*. Real-time qPCR using SYBR Green was performed for *Escherichia coli*, the genus *Enterococcus* and the *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* group. Primer and probe specificities were previously assessed by Furet *et al.* [33]. The TaqMan probes were synthesised by Life Technologies (Saint Aubin, France). The primers were purchased from Sigma Aldrich.

Real-time PCR conditions

PCR was performed in 25 µl PCR volumes containing 15 µl Power SYBR® Green PCR Master Mix 2X (Life Technologies) or TaqMan Universal PCR 2 (Life Technologies), 0.20 µM of each primer, 0.25 µM of each probe and 10 µl of template DNA at the appropriate dilution (inhibition testing section). Natural Multiplate™ Low-Profile 96-Well Unskirted PCR Plates and a Chromo4 LightCycler were used (Bio-rad, Marnes-La-Coquette, France). The cycling program included a 10 min incubation at 95°C followed by 40 cycles consisting of 95°C for 30 s, 60°C for 1 min. For SYBR-Green® amplifications, to improve amplification specificity, a melting curve analysis of the PCR products was performed by ramping the temperature to 95°C for 10 s and back to 50°C for 15 s followed by incremental increases of 0.5°C/s up to 95°C. The cycle threshold (Ct), *i.e.* the number of PCR cycles necessary to reach the threshold fluorescence level, was manually determined for each run by the user. All the samples were analysed in duplicate.

PCR Setup Controls

Multiple Non Template Controls (NTC) were included in every assay and amplification of all NTC wells invalidated the entire qPCR run, leading to a repeat run.

Generation of standard curves

Genomic DNA from the different type strains was used to prepare ten-fold dilution series from 0.1 $\log_{10}$ to 8 $\log_{10}$ CFU equivalent. Sterile water (15 µl) was used as a negative control. A standard curve for each type strain was generated by plotting the Ct against the logarithm of bacterial quantity ($\log_{10}$ CFU equivalent) for each run.

Inhibition Testing

The TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents kit (Life Technologies) was used as an exogenous amplification control to check the appropriate dilution used in real-time PCR [34]. This IPC inhibition assay comprises a control qPCR assay in which the IPC DNA is the only amplifiable target performed in the presence of water. This generates a reference Ct value for the IPC amplicon, characteristic of an uninhibited assay. If the water is substituted with DNA from a sample, a shift of greater than one cycle, to a higher Ct and reduced amplification efficiency indicates the presence of PCR inhibitors in the sample. Each qPCR reaction comprised 1X TaqMan Universal PCR 2, 1X Exo IPC Mix, and 5 µl of diluted sample extract or water. Thermal cycling conditions were 1 cycle of 95°C for 3 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 1 min.

Determination of DON concentrations in feces

Concentrations of DON and its main metabolite deepoxy-deoxynivalenol (DOM-1) in feces from donors and rats were analysed by an adapted method from Sørensen and Elbæk (2005) using a Liquid Chromatography coupled with tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) (Laboratory LDA 22, Ploufragan, France) [35].

Data normalization

To overcome the fact that fecal samples may contain more or less water, normalization was done by subtracting the $\log_{10}$ CFU/g obtained for the "all bacteria" group from the $\log_{10}$ CFU/g for the other bacterial groups [33,36]. The data are presented as the mean of normalized $\log_{10}$ value ± standard deviation of colony-forming unit equivalent per gram of fresh feces ($\log_{10}$ CFU/g).

Statistics

Statistical analysis was performed with SYSTAT V.13 (Systat Software, Chicago, USA). Bacterial levels were compared using the analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's Multiple Comparison test to compare each sampling time during and after the treatment to the sampling time before the treatment (control). DON concentrations in feces were compared using the analysis of variance (ANOVA). P values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Evaluation of the qPCR performances

PCR efficiencies were calculated from the slopes of the log-linear portion of the standard curves that were run in each plate. The efficiency range was 82–111% corresponding to good amplification efficiency. The dynamic range covered at least 5 $\log_{10}$ concentrations of magnitude, and included the expected interval for the target nucleic acids to be quantified.

We assessed the presence of inhibitors in the DNA samples that could interfere with the following qPCR method. One third of the DNA extracts from fecal samples were included in the inhibition assay and results indicated that no inhibition was present in these samples diluted at 10^{-4} and 10^{-5}. In contrast, results from samples diluted at 10^{-3} showed shifts of more than 1 Ct with respect to the reference Ct value, indicative of the presence of PCR inhibitors in these samples. DNA extracts were therefore used at the appropriate dilution of 10^{-4}.

The limit of quantification was 6 $\log_{10}$ CFU/g, corresponding to the lowest value quantified in the fecal samples with good repeatability (<0.5 Ct).

Establishment of the human gut microbiota in human microbiota-associated rats

Figure 1 presents the fecal concentration levels for dominant and subdominant bacterial groups in the HMA rats after 2 weeks of stabilization and the corresponding human donors. With the exception of bifidobacteria and the *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* group, all other groups showed concentrations in rat feces close to their concentrations in human feces. These bacteria from human donors established very well in the rat gut tract, in contrast to bifidobacteria and the *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* group which were below the limit of detection of 5.46 and 5.03 $\log_{10}$ CFU/g respectively. Our results indicate that these bacterial groups established in rats at lower levels than the inoculating bacterial community from the human donors.

DON concentrations in feces

DON concentrations in donors' feces were below the limit of detection (3 µg/kg of feces).

In rats, fecal samples from each rat housed in the same isolator were pooled at days 16 and 27. Fecal DON concentrations for each isolator, and for each sampling time, ranged from 240 to 360 µg/kg of feces. Differences in DON concentrations between isolators or sampling time were not significant. Therefore, an overall mean of DON was estimated at 284.4±45.8 µg/kg of feces between day 16 and 27.

DOM-1 was not detected in fecal samples of rats (limit of detection: 3 µg/kg of feces).

Changes of the gut microbiota in response to DON treatment

Table 2 shows a general overview of the evolution over time of the bacterial groups targeted for each isolator. Despite a different intestinal microbiota in each isolator, similar trends were generally observed for the dominant and subdominant groups targeted in the feces of the humanized rats.

During oral DON exposure, a significant increase of 0.5 $\log_{10}$ was observed for the *Bacteroides/Prevotella* group during the first 3 weeks of administration in isolators I, III and IV ($P<0.01$). Concentrations returned to basal levels similar to that of the control at D0 before the end of the treatment, indicating a transient effect (figure 2).

Concentrations of bifidobacteria and the *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* group remained below the limit of detection of 5.46 and 5.03 $\log_{10}$ CFU/g respectively in all DNA extracts. DON seemed to have no effect on these bacterial groups.

During the experimental period, large interindividual fluctuations with SDs higher than 0.5 $\log_{10}$ CFU/g were observed in the *Enterococcus* and *Clostridium coccoides* groups.

The *Clostridium leptum* group did not seem to be affected by deoxynivalenol, and remained stable in 3 of the 4 isolators. However, in isolator III, a significant increase of 0.3 $\log_{10}$ CFU/g was observed at days 16 and 21 of the treatment ($P<0.05$).

With the exception of isolator III where *Escherichia coli* was not detected, concentrations of this species decreased at day 27 *i.e.* the end of the DON treatment. This decrease (0.9 $\log_{10}$ CFU/g) was significant for isolators I and II ($P<0.001$). This drop remained stable until the end of the experiment.

Discussion

In this study, we investigated the effect of an oral subchronic exposure of DON at NOAEL on the intestinal microbiota balance. To the best of our knowledge, this study is the first to analyze the impact of DON on the human intestinal microbiota by real-time PCR in HMA rats.

To avoid ethical issues and long monitoring periods, HMA rodents are widely used to evaluate the effect of contaminants or to elucidate whether the gut commensal microbiota is important for human health [13,37,38]. In our study, 5 of 7 dominant (*Bacteroides/Prevotella, Clostridium coccoides, Clostridium leptum*, bifidobacteria) and subdominant (*Escherichia coli, Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus Enterococcus*) bacterial groups of human gut microbiota could be successfully established in the germ free rats at levels comparable to the human donors *i.e. Bacteroides/Prevotella, Clostridium coccoides* and *Clostridium leptum* groups, *Escherichia coli and* genus *Enterococcus*. However, bifidobacteria and the *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* group were not detected in our experimental conditions. Several studies have previously shown that these bacteria coming from humans decreased in germ free rodents after

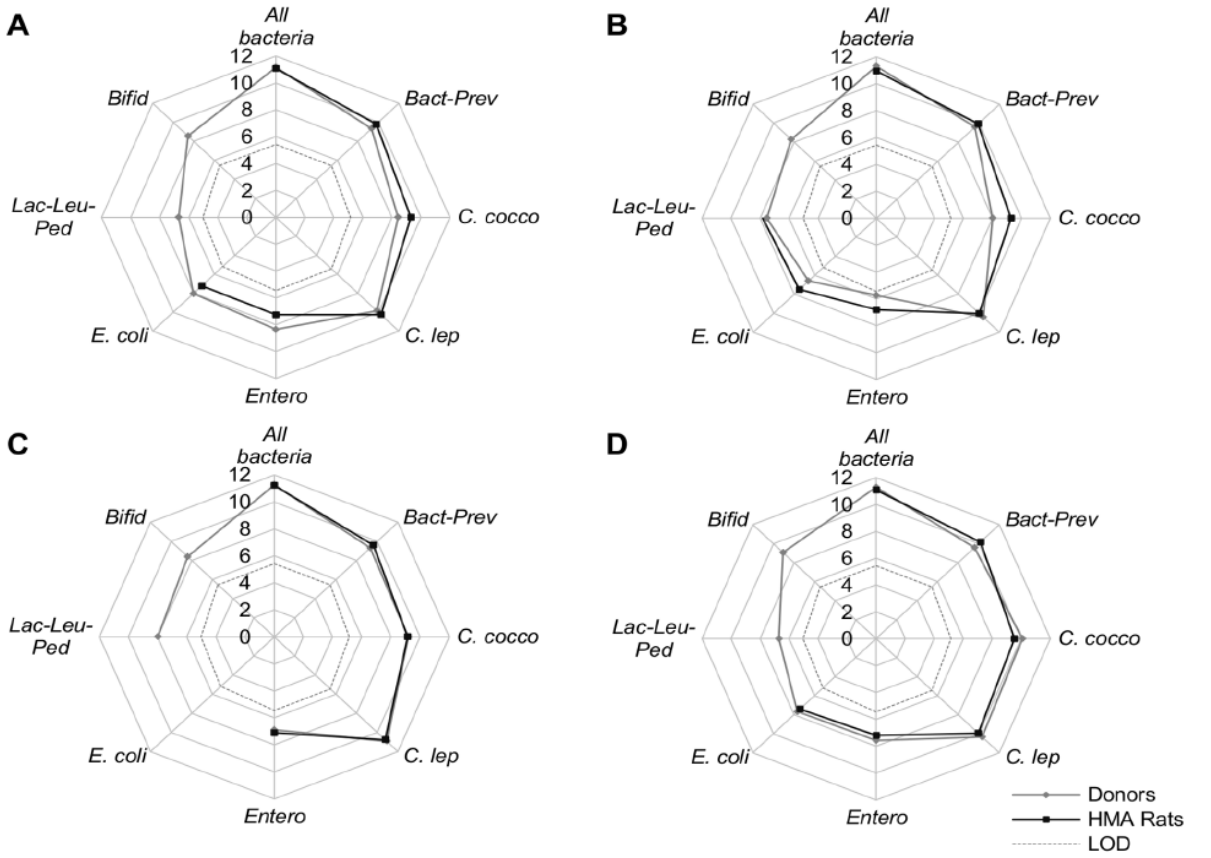


Figure 1. Fecal concentrations of each target bacterial group of the HMA rats and in donors. (A) Isolator I; (B) Isolator II; (C) Isolator III; (D) Isolator IV; Results obtained by qPCR were expressed as the mean of the $\log_{10}$ value (for rats n = 5 except for isolator IV where n = 4; for humans n = 2 repetitions) of CFU/g. *Bact-Prev*: *Bacteroides-Prevotella* group; *C. cocco*: *Clostridium coccoides* group; *C. lep*: *Clostridium leptum* group; *Bifid*: Genus *Bifidobacterium*; *Entero*: Genus *Enterococcus*; *E. coli*: *Escherichia coli*; *Lac-Leu-Ped*: *Lactobacillus-Leuconostoc-Pediococcus* group; LOD: limit of detection.
doi:10.1371/journal.pone.0080578.g001

inoculation, reaching undetectable levels in fecal samples of animals [39–42]. Nevertheless, these results demonstrate that the established bacterial community of the feces recipient rats remains similar to the inoculating bacterial community of the human donors. These studies confirm that this animal model is relevant for exploring the effect of food contaminants on the human gut microbiota.

Interactions between bacteria and deoxynivalenol have been demonstrated in several *in vitro* studies dealing with mycotoxin-transforming microorganisms. Several studies have reported transformation of deoxynivalenol by microorganisms from a variety of environmental samples including field soils, wheat leaves and animal gut contents [27,28,43–46]. This has been assessed with success for potential applications in detoxifying mycotoxins in contaminated food and feed [47]. For example, lactic acid bacteria strains have the ability to remove DON *in vitro* by adsorption of the mycotoxin by the cell wall [48,49]. This specific binding of DON was able to restrict the consequences of DON on Caco-2 as was shown by Turner *et al.* with the strain *Lactobacillus rhamnosus* [50]. *Eubacterium* sp. is also beneficial in counteracting the toxicity of DON in broilers through the deepoxidization of the mycotoxin in contaminated diets [51]. These observations demonstrate clear interactions between DON and bacteria, which could have impacts on both the bacteria and DON levels. DON absorption is incomplete in the intestine with a bioavailability of about 54% in pigs [52] and 50% in conventional rats (personal data), suggesting that a fraction of ingested DON reaches the colon. This suggestion has been confirmed by Nagl *et al.* in rats, who observed that about 4% of the administered dose of DON were recovered in the feces of animals [53]. The quantity of DON that was found in the feces of HMA rats during the treatment suggests that this food contaminant could potentially influence gut microbiota. Indeed, in our study, the significant increase of the *Bacteroides/Prevotella* group and the significant decrease of *Escherichia coli* indicate that DON at the NOAEL (100 µg/kg bw) could induce biological effects on the dynamic of the humanized gut microbiota. Our findings are in accordance with Waché *et al.* who showed changes in the gut microbiota composition of pigs fed with diet naturally contaminated with DON (136 µg/kg bw) [19]. However, these authors reported, using selective media, an increase of aerobic mesophilic bacteria and a decrease of anaerobic sulfite-reducing bacteria during DON treatment [19], which is not consistent with our findings. This difference could be due to the method used to quantify the bacterial population. Indeed, unlike culture-dependent methods, qPCR quantifies all targeted bacteria irrespective of the state (cultivable, viable non-cultivable, non-cultivable and dead bacteria) while conventional microbiological methods only identifies

Table 2. Time course evolution of bacteria levels in the 4 isolators during the experimental period.

		Treatment (days)					
		Before	During				After
Isolator	Target organism	0	7	16	21	27	37
ISO I	*All bacteria*	11.07±0.14	10.77±0.18	10.82±0.09	10.77±0.26	11.18±0.08	11.10±0.17
	Bact-Prev	−1.28±0.15	−0.91±0.11**	−0.79±0.04***	−0.88±0.24**	−1.24±0.12	−1.25±0.19
	C. cocco	−1.76±0.30	−1.46±0.33	−1.39±0.44	−2.04±0.69	−2.03±0.36	−1.89±0.78
	C. lep	−0.82±0.05	−0.68±0.17	−0.69±0.04	−0.87±0.26	−0.94±0.09	−1.02±0.07
	Bifid	< LOD[a]	< LOD[a]	< LOD[a]	< LOD[a]	< LOD[a]	< LOD[a]
	Entero	−3.81±0.79	−4.14±0.24	−4.15±0.55	−4.72±0.80	−4.89±0.36	−4.85±0.88
	E. coli	−3.84±0.30	−3.60±0.10	−3.74±0.27	−3.97±0.32	−4.94±0.15***	−4.57±0.31***
	Lac-Leu-Ped	< LOD[b]	< LOD[b]	< LOD[b]	< LOD[b]	< LOD[b]	< LOD[b]
ISO II	*All bacteria*	10.94±0.10	10.75±0.10	10.74±0.12	10.75±0.07	11.09±0.05	11.10±0.13
	Bact-Prev	−1.01±0.18	−0.74±0.11**	−0.69±0.09**	−0.84±0.13	−1.09±0.08	−1.22±0.12*
	C. cocco	−1.65±0.15	−1.56±0.25	−1.48±0.32	−1.71±0.42	−1.97±0.25	−2.18±0.13*
	C. lep	−0.90±0.21	−0.85±0.11	−0.98±0.06	−1.02±0.09	−0.95±0.11	−0.96±0.14
	Bifid	< LOD[a]	< LOD[a]	< LOD[a]	< LOD[a]	< LOD[a]	< LOD[a]
	Entero	−4.13±0.88	−4.22±0.60	−4.81±0.50	−4.79±87	−4.83±0.71	−5.01±0.44
	E. coli	−3.44±0.48	−3.26±0.16	−3.58±0.16	−3.69±0.40	−4.35±0.41***	−4.38±0.10***
	Lac-Leu-Ped	−3.13±1.20	−3.32±1.12	−3.45±1.31	−3.16±1.67	−3.56±1.23	−3.65±1.22
ISO III	*All bacteria*	11.22±0.17	10.68±0.20	10.74±0.15	10.66±0.13	11.30±0.15	11.28±0.11
	Bact-Prev	−1.61±0.20	−1.08±0.25***	−1.09±0.11***	−1.08±0.14***	−1.44±0.20	−1.51±0.16
	C. cocco	−2.06±0.39	−2.01±0.30	−1.82±0.55	−1.81±0.50	−1.91±0.55	−2.41±0.23
	C. lep	−0.45±0.16	−0.21±0.15	−0.15±0.10*	−0.18±0.12*	−0.42±0.20	−0.35±0.11
	Bifid	< LOD[a]	< LOD[a]	< LOD[a]	< LOD[a]	< LOD[a]	< LOD[a]
	Entero	−4.12±0.48	−4.27±0.62	−4.32±0.72	−4.14±0.77	−4.00±0.38	−4.71±0.27
	E. coli	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
	Lac-Leu-Ped	< LOD[b]	< LOD[b]	< LOD[b]	< LOD[b]	< LOD[b]	< LOD[b]
ISO IV	*All bacteria*	11.07±0.14	10.63±0.06	10.63±0.15	10.65±0.11	11.10±0.13	11.20±0.08
	Bact-Prev	−0.90±0.09	−0.30±0.16***	−0.30±0.18***	−0.20±0.11***	−0.72±0.16	−0.83±0.14
	C. cocco	−1.54±0.23	−0.77±0.47	−1.19±0.63	−1.20±0.64	−1.56±0.44	−1.27±0.36
	C. lep	−1.12±0.18	−0.67±0.24	−0.75±0.36	−0.74±0.25	−1.05±0.28	−1.12±0.14
	Bifid	< LOD[a]	< LOD[a]	< LOD[a]	< LOD[a]	< LOD[a]	< LOD[a]
	Entero	−3.87±0.60	−3.86±0.29	−4.05±0.50	−3.36±0.20	−4.25±0.71	−3.79±0.47
	E. coli	−3.66±0.54	−3.31±0.28	−3.59±0.24	−3.46±0.24	−4.03±0.49	−3.93±0.15
	Lac-Leu-Ped	< LOD[b]	< LOD[b]	< LOD[b]	< LOD[b]	< LOD[b]	< LOD[b]

Results obtained by qPCR were expressed for all bacteria as the mean of the $\log_{10}$ value (n = 5 except for isolator IV where n = 4) ± standard deviation of CFU/g. Normalization was done by subtracting the $\log_{10}$ CFU/g obtained for the "all bacteria" group from the $\log_{10}$ CFU/g for the other bacterial groups. Results were expressed for the different bacterial groups as the mean of normalized $\log_{10}$ value (n = 5 except for isolator IV where n = 4) ± standard deviation of CFU/g.

*P<0.05;

**P<0.01;

***P<0.001.

(a)*Bifid* LOD = 5.46 $\log_{10}$ CFU/g;

(b)Lac-Leu-Ped LOD = 5.03 $\log_{10}$ CFU/g; Bact-Prev: Bacteroides-Prevotella group; C. cocco: Clostridium coccoides group; C. lep: Clostridium leptum group; Bifid: Genus Bifidobacterium; Entero: Genus Enterococcus; E. coli: Escherichia coli; Lac-Leu-Ped: Lactobacillus-Leuconostoc-Pediococcus group.

doi:10.1371/journal.pone.0080578.t002

cultivable bacteria (estimated at <30% of the gut microbiota) [54]. In addition, their experimental animal model was the swine where the indigenous gut bacteria are different from those of humans.

In this study, we observed the significant increase of the Bacteroides/Prevotella group. In Human, this shift may be associated to diseases as reviewed by Clemente *et al.* [55]. For example, individuals with Crohn's disease or celiac diseases exhibited a higher abundance of *Bacteroides* than healthy individuals [56,57].

With the gut microbiota dysbiosis observed in this study, it could be hypothesized that DON may promote the passage of pathogenic micro-organisms present in food and water across the intestinal epithelium. These effects represent a potential health threat as they could contribute to an increase in bacterial infections in animals or humans exposed to DON. This has

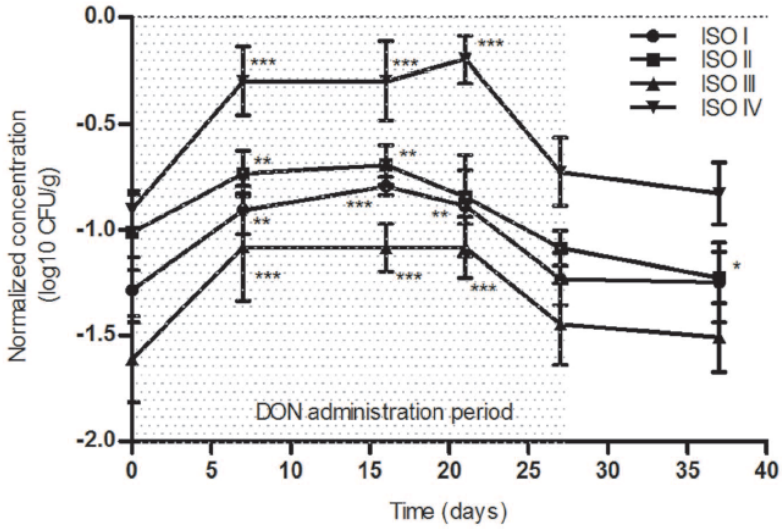


Figure 2. Time course evolution of *Bacteroides-Prevotella* normalized concentrations in the 4 isolators during the experimental period. For the different bacterial groups, results were expressed as the mean of normalized $\log_{10}$ value (n = 5 except for isolator IV where n = 4) ± standard deviation of CFU/g.* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001.
doi:10.1371/journal.pone.0080578.g002

already been observed by Oswald *et al.* in piglets treated with fumonisin B1 [31], where mycotoxin treatment was associated with an increased bacterial colonization by pathogenic *Escherichia coli* in the intestine of animals.

In addition, DON is known to induce proinflammatory responses in experimental animals [58]. *In vivo* and *in vitro* studies have also shown that immune cells (including macrophages, B and T lymphocytes and natural killer cells) are very sensitive to DON [59,60]. DON may therefore contribute to modulate infectious diseases through alterations in immune function.

Although this study and others [19,30] have shown a potential hazard of mycotoxins on the gut microbiota, the NOAEL of these food contaminants is established only on toxicological data. The International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Veterinary Medicinal Products (VICH) provides a general approach to establishing a microbiological acceptable daily intake (http://www.vichsec.org) to evaluate the safety of residues of veterinary drugs in animal-derived foods for humans. This approach used for veterinary drugs could be extended to mycotoxins which are prevalent food contaminants.

Conclusions

In conclusion, this study provides data that could help to determine the public health risk of deoxynivalenol on the human gut microbiota.

On one hand, using qPCR we have identified particular genera in human gut microbiota whose concentrations vary after DON exposure at the NOAEL dose. As this effect could have consequences for human health, further investigation would be interesting. Therefore, in order to improve risk assessment in humans, studies on the different functions of the gut microbiota could be performed (barrier effect, enzymatic activities, metabolic profiles) after exposure to DON. Moreover, co-occurrence of mycotoxins is widespread and mycotoxins can be released from their masked forms; therefore, experiments with combinations of mycotoxins and their different forms are necessary and complementary to our study.

On the other hand, we have demonstrated that the NOAEL established for deoxynivalenol based on a toxicological study can have, nonetheless, a microbiologically significant effect by modifying the gut microbiota. Therefore, we suggest that the investigation of the influence of low concentration of mycotoxins on human gut microbiota as a part of the risk assessment process.

Overall, the findings from this investigation could serve as a template for future impact studies of food contaminants on the human gut microbiota.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MSC APG JGR ML. Performed the experiments: MSC APG PH JGR. Analyzed the data: MSC APG ML. Contributed reagents/materials/analysis tools: MSC PH JGR. Wrote the paper: MSC APG ML.

References

1. Schothorst RC, van Egmond HP (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. Toxicology Letters 153: 133–143.
2. Canady R, Coker R, Egan S, Krska R, Kuiper-Goodman T, et al. (2001) Deoxynivalenol. Safety evaluation of certain mycotoxins in food (pp. 419–555). Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Food Additives Series 47.
3. Turner PC, Burley VJ, Rothwell JA, White KL, Cade JE, et al. (2008) Deoxynivalenol: Rationale for development and application of a urinary biomarker. Food Additives and Contaminants 25: 864–871.
4. Turner PC, Hopton RP, Lecluse Y, White KLM, Fisher J, et al. (2010) Determinants of Urinary Deoxynivalenol and De-epoxy Deoxynivalenol in Male Farmers from Normandy, France. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58: 5206–5212.

5. Turner PC, Hopton RP, White KLM, Fisher J, Cade JE, et al. (2011) Assessment of deoxynivalenol metabolite profiles in UK adults. Food and Chemical Toxicology 49: 132–135.
6. CAST (2003) Mycotoxins: risks in plant animal and human systems. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology. 199 p.
7. Ramakrishna Y, Bhat RV, Ravindranath V (1989) Production of deoxynivalenol by *Fusarium* isolates from samples of wheat associated with a human mycotoxicosis outbreak and from sorghum cultivars. Applied and Environmental Microbiology 55: 2619–2620.
8. Bhat R, Ramakrishna Y, Beedu S, Munshi KL (1989) Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat production in Kashmir Valley, India. The Lancet 333: 35–37.
9. Luo X (1988) Outbreaks of moldy cereals poisoning in China. Issues in food safety: 56–63.
10. Pestka JJ (2007) Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. Animal Feed Science and Technology 137: 283–298.
11. Pestka J (2010) Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. Archives of Toxicology 84: 663–679.
12. Iverson F, Armstrong C, Nera E, Truelove J, Fernie S, et al. (1995) Chronic Feeding Study of deoxynivalenol in B6C3F1 male and female mice. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 15: 283–306.
13. Perrin-Guyomard A, Poul J-M, Laurentie M, Sanders P, Fernández AH, et al. (2006) Impact of ciprofloxacin in the human-flora-associated (HFA) rat model: Comparison with the HFA mouse model. Regulatory Toxicology and Pharmacology 45: 66–78.
14. Sirot V, Fremy J-M, Leblanc J-C (2013) Dietary exposure to mycotoxins and health risk assessment in the second French total diet study. Food and Chemical Toxicology 52: 1–11.
15. Le Bail M, Verger P, Doré T, Fourbet JF, Champeil A, et al. (2005) Simulation of consumer exposure to deoxynivalenol according to wheat crop management and grain segregation: Case studies and methodological considerations. Regulatory Toxicology and Pharmacology 42: 253–259.
16. Leblanc J-C, Malmauret L, Delobel D, Verger P (2002) Simulation of the Exposure to Deoxynivalenol of French Consumers of Organic and Conventional Foodstuffs. Regulatory Toxicology and Pharmacology 36: 149–154.
17. Turner PC, Rothwell JA, White KLM, Gong Y, Cade JE, et al. (2008) Urinary deoxynivalenol is correlated with cereal intake in individuals from the United Kingdom. Environmental Health Perspectives 116: 21–25.
18. Warth B, Sulyok M, Fruhmann P, Berthiller F, Schuhmacher R, et al. (2012) Assessment of human deoxynivalenol exposure using an LC–MS/MS based biomarker method. Toxicology Letters 211: 85–90.
19. Waché Y, Valat C, Postollec G, Bougeard S, Burel C, et al. (2008) Impact of Deoxynivalenol on the Intestinal Microflora of Pigs. International Journal of Molecular Sciences 10: 1–17.
20. Rotter BA (1996) Toxicology of Deoxynivalenol (Vomitoxin). Journal of Toxicology and Environmental Health 48: 1–34.
21. Gratz SW, Duncan G, Richardson AJ (2013) The human fecal microbiota metabolizes deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside and may be responsible for urinary deepoxy-deoxynivalenol. Applied and Environmental Microbiology 79: 1821–1825.
22. He P, Young LG, Forsberg C (1992) Microbial transformation of deoxynivalenol (vomitoxin). Appl Environ Microbiol 58: 3857–3863.
23. Ito M, Sato I, Ishizaka M, Yoshida SI, Koitabashi M, et al. (2013) Bacterial cytochrome P450 System catabolizing the *Fusarium* toxin deoxynivalenol. Applied and Environmental Microbiology 79: 1619–1628.
24. Ito M, Sato I, Koitabashi M, Yoshida S, Imai M, et al. (2012) A novel actinomycete derived from wheat heads degrades deoxynivalenol in the grain of wheat and barley affected by *Fusarium* head blight. Applied Microbiology and Biotechnology: 1–12.
25. Kollarczik B, Gareis M, Hanelt M (1994) *In vitro* transformation of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone by the normal gut microflora of pigs. Natural Toxins 2: 105–110.
26. Niderkorn V, Boudra H, Morgavi DP (2006) Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. Journal of Applied Microbiology 101: 849–856.
27. Young JC, Zhou T, Yu H, Zhu H, Gong J (2007) Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. Food and Chemical Toxicology 45: 136–143.
28. Zou ZY, He ZF, Li HJ, Han PF, Meng X, et al. (2012) *In vitro* removal of deoxynivalenol and T-2 toxin by lactic acid bacteria. Food Science and Biotechnology 21: 1677–1683.
29. Becker B, Bresch H, Schillinger U, Thiel PG (1997) The effect of fumonisin B1 on the growth of bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology 13: 539–543.
30. Burel C, Tanguy M, Guerre P, Boilletot E, Cariolet R, et al. (2013) Effect of Low Dose of Fumonisins on Pig Health: Immune Status, Intestinal Microbiota and Sensitivity to *Salmonella*. Toxins 5: 841–864.
31. Oswald IP, Desautels C, Laffitte JI, Fournout S, Peres SY, et al. (2003) Mycotoxin Fumonisin B1 Increases Intestinal Colonization by Pathogenic *Escherichia coli* in Pigs. Applied and Environmental Microbiology 69: 5870–5874.
32. Tenk I, Fodor É, Szathmáry 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. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene 1 Abt Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie 252: 384–393.
33. Furet J-P, Firmesse O, Gourmelon M, Bridonneau C, Tap J, et al. (2009) Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. FEMS Microbiology Ecology 68: 351–362.
34. Johnson GL, Bibby DF, Wong S, Agrawal SG, Bustin SA (2012) A MIQE-Compliant Real-Time PCR Assay for *Aspergillus* Detection. PLoS ONE 7: e40022.
35. Sørensen L, Elbæk T (2005) Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B 820: 183–196.
36. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimaraes V, Sokol H, et al. (2009) The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. BMC Microbiology 9: 123.
37. Yi P, Li L (2011) The germfree murine animal: An important animal model for research on the relationship between gut microbiota and the host. Veterinary Microbiology.
38. Wos-Oxley ML, Bleich A, Oxley APA, Kahl S, Janus LM, et al. (2012) Comparative evaluation of establishing a human gut microbial community within rodent models. Gut Microbes 3: 234–249.
39. Frese SA, Benson AK, Tannock GW, Loach DM, Kim J, et al. (2011) The Evolution of Host Specialization in the Vertebrate Gut Symbiont *Lactobacillus reuteri*. PLoS Genet 7: e1001314.
40. Bernbom N, Nørrung B, Saadbye P, Mølbak L, Vogensen FK, et al. (2006) Comparison of methods and animal models commonly used for investigation of fecal microbiota: Effects of time, host and gender. Journal of Microbiological Methods 66: 87–95.
41. Ducluzeau R, Ladiré M, Raibaud P (1984) Effet de l'ingestion de son de blé sur la flore microbienne fécale de donneurs humains et de souris gnotoxéniques receveuses, et sur les effets de barrière exercés par ces flores à l'égard de divers microorganismes potentiellement pathogènes. Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie 135: 303–318.
42. Hirayama K, Kawamura S, Mitsuoka T (1991) Development and Stability of Human Faecal Flora in the Intestine of Ex-germ-free Mice. Microbial Ecology in Health and Disease 4: 95–99.
43. Sato I, Ito M, Ishizaka M, Ikunaga Y, Sato Y, et al. (2012) Thirteen novel deoxynivalenol-degrading bacteria are classified within two genera with distinct degradation mechanisms. FEMS Microbiology Letters 327: 110–117.
44. Islam R, Zhou T, Young JC, Goodwin PH, Pauls KP (2012) Aerobic and anaerobic de-epoxydation of mycotoxin deoxynivalenol by bacteria originating from agricultural soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology 28: 7–13.
45. Yu H, Zhou T, Gong J, Young C, Su X, et al. (2010) Isolation of deoxynivalenol-transforming bacteria from the chicken intestines using the approach of PCR-DGGE guided microbial selection. BMC Microbiology 10: 182.
46. Guan S, He J, Young JC, Zhu H, Li X-Z, et al. (2009) Transformation of trichothecene mycotoxins by microorganisms from fish digesta. Aquaculture 290: 290–295.
47. Zhou T, He J, Gong J (2008) Microbial transformation of trichothecene mycotoxins. World Mycotoxin Journal 1: 23–30.
48. El-Nezami HS, Chrevatidis A, Auriola S, Salminen S, Mykkänen H (2002) Removal of common *Fusarium* toxins in vitro by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. Food Additives and Contaminants 19: 680–686.
49. Franco TS, Garcia S, Hirooka EY, Ono YS, dos Santos JS (2011) Lactic acid bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification. Journal of Applied Microbiology 111: 739–748.
50. Turner P, Wu Q, Piekkola S, Gratz S, Mykkänen H, et al. (2008) *Lactobacillus rhamnosus* strain GG restores alkaline phosphatase activity in differentiating Caco-2 cells dosed with the potent mycotoxin deoxynivalenol. Food and Chemical Toxicology 46: 2118–2123.
51. Awad W, Bohm J, Razzazi-Fazeli E, Ghareeb K, Zentek J (2006) Effect of addition of a probiotic microorganism to broiler diets contaminated with deoxynivalenol on performance and histological alterations of intestinal villi of broiler chickens. Poultry Science 85: 974–979.
52. Goyarts T, Dänicke S (2006) Bioavailability of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig. Toxicology Letters 163: 171–182.
53. Nagl V, Schwartz H, Krska R, Moll W-D, Knasmüller S, et al. (2012) Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in rats. Toxicology Letters 213: 367–373.
54. Fraher MH, O'Toole PW, Quigley EMM (2012) Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. Nat Rev Gastroenterol Hepatol advance online publication.
55. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R (2012) The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. Cell 148: 1258–1270.
56. Nadal I, Donant E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y (2007) Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. Journal of Medical Microbiology 56: 1669–1674.
57. Dicksved J, Halfvarson J, Rosenquist M, Jarnerot G, Tysk C, et al. (2008) Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. ISME J 2: 716–727.
58. Amuzie CJ, Harkema JR, Pestka JJ (2008) Tissue distribution and proinflammatory cytokine induction by the trichothecene deoxynivalenol in the mouse: Comparison of nasal vs. oral exposure. Toxicology 248: 39–44.

59. Atkinson HAC, Miller K (1984) Inhibitory effect of deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and zearalenone on induction of rat and human lymphocyte proliferation. Toxicology Letters 23: 215–221.
60. Islam MR, Roh YS, Kim J, Lim CW, Kim B (2013) Differential immune modulation by deoxynivalenol (vomitoxin) in mice. Toxicology Letters 221: 152–163.
61. Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A (2004) Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. Journal of Applied Microbiology 97: 1166–1177.
62. Huijsdens XW, Linskens RK, Mak M, Meuwissen SGM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, et al. (2002) Quantification of Bacteria Adherent to Gastrointestinal Mucosa by Real-Time PCR. Journal of Clinical Microbiology 40: 4423–4427.

Conclusions / Importance

Le modèle expérimental que nous avons utilisé a permis de montrer l'impact bactériologique d'une exposition orale au DON sur la composition du MIH et d'identifier les bactéries sensibles dans le cas de cette expérience. Cette étude apporte des données complémentaires à l'analyse du risque lié à l'exposition du DON chez l'Homme et pourrait être complétée par des expériences supplémentaires de métagénomique.

Discussion et Perspectives

Tableau 11 : Avantages et inconvénients des modèles expérimentaux utilisés au cours de la thèse dans le cadre de l'évaluation de l'impact du DON sur le microbiote intestinal humain.

Modèle expérimental	Avantages	Inconvénients
Porc conventionnel	-Physiologie cardiovasculaire proche de celle de l'Homme	-Forte biodisponibilité (70%) comparée au rat (47%) -Sensibilité à la NOAEL -Microbiote intestinal différent de celui de l'Homme -Microbiote intestinal potentiellement capable de dégrader le DON
Rat conventionnel	-Utilisation en toxicologie et en cinétique -Faible biodisponibilité (47%) comparée au porc (70%)	-Microbiote intestinal différent de celui de l'Homme -Microbiote intestinal potentiellement capable de dégrader le DON
Rat à flore humanisée	-Microbiote intestinal proche de celui de l'Homme -Faible biodisponibilité probable (cf rat conventionnel)	-Études cinétiques fastidieuses et onéreuses

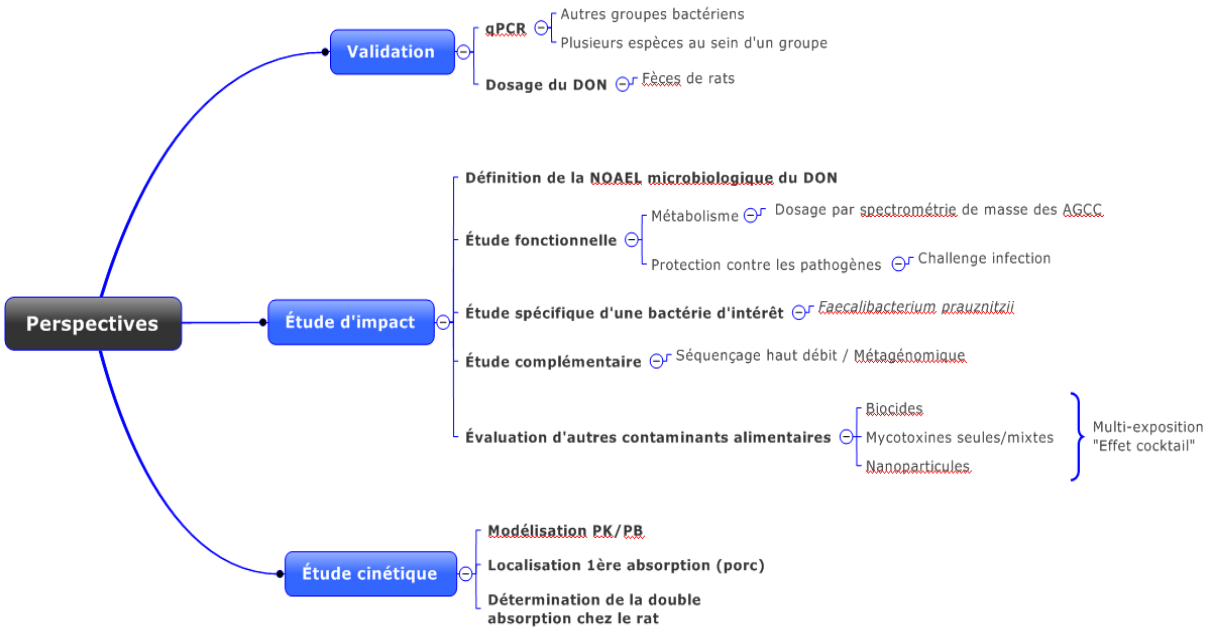


Figure 23 : Perspectives aux travaux de thèse.

Le risque toxicologique associé à une exposition au déoxynivalénol est bien caractérisé. Mais malgré les efforts de recherche pour caractériser les multiples aspects de l'impact d'une contamination par le DON, il y avait une insuffisance d'un point de vue risque bactériologique. En effet, alors que de nombreuses observations montraient la présence du DON dans le tractus intestinal et l'existence d'interactions entre le DON et les bactéries, les questions concernant son impact sur le MIH n'avaient été que très peu abordées. L'objectif de la thèse s'inscrivait donc dans une démarche d'approfondissement des connaissances sur l'impact d'une contamination en DON sur le microbiote intestinal humain.

Dans un premier temps, dans le cadre de l'évaluation du risque associé au DON, nous avons déterminé, lors d'études de cinétique, le devenir de ce contaminant chez le rat (modèle expérimental utilisé en toxicologie) et chez le porc (modèle expérimental se rapprochant le plus de l'Homme d'un point de vue physiologique). Ces études ont mis en évidence des différences de paramètres cinétiques chez ces 2 modèles mettant ainsi en lumière un certain nombre d'avantages et d'inconvénients selon les objectifs des études (tableau 11). Un des paramètres majeurs à caractériser lors d'une exposition par voie orale est la biodisponibilité. Pour le DON, la biodisponibilité est de 70% chez le porc et de 47% chez le rat, cette différence implique que le porc semble être un modèle plus adéquat pour confirmer la NOAEL vis-à-vis des effets toxicologiques indésirables. En revanche, dans le cas d'une étude d'impact sur le microbiote intestinal, le rat semble être un modèle plus approprié puisque la biodisponibilité est plus faible, le DON se retrouve en plus grande quantité dans le tractus digestif et exerce une pression plus forte sur le microbiote.

Nous avons également observé et mis en évidence pour la première fois un processus de double absorption du DON chez le porc. D'un point de vue cinétique, pour compléter notre étude, il pourrait être intéressant de localiser précisément (estomac ou première partie de l'intestin) le site de la première absorption (figure 23). Il conviendrait d'approfondir la cinétique chez le rat conventionnel avec un nombre d'échéances plus important en début de cinétique afin de vérifier si cette double absorption est également présente.

La maîtrise des cinétiques chez deux espèces devrait permettre d'établir un modèle pharmacocinétique basé sur la physiologie (PB/PK), approche recommandée dans l'analyse de risque [249, 250]. L'intérêt de ce type de modèle est de pouvoir simuler et prédire sur la base des connaissances physiologiques et des niveaux d'exposition, les concentrations de DON qui pourraient être atteintes chez l'Homme comme cela a été réalisé pour d'autres contaminants comme les pesticides [251]. Ces simulations pourraient être corroborées par des études épidémiologiques sur des populations à risque comme les enfants.

Dans un second temps, afin de garantir la fiabilité des résultats fournis par les analyses moléculaires, nous avons suivi une procédure de validation statistique de la qPCR. Cette validation a été réalisée sur 4 espèces bactériennes cibles ayant des différences caractéristiques pouvant influencer la méthode. Ces caractéristiques concernaient la paroi bactérienne dont la nature pouvait influencer l'étape d'extraction et la technologie de fluorescence qui pouvait modifier l'étape d'amplification. Pour compléter la démarche, il conviendrait de valider tous les groupes bactériens ciblés, et de tester la variabilité inter espèces au sein des différents taxa, en augmentant le nombre d'espèces bactériennes testées pour chaque groupe cible (figure 23).

Lors de l'étude d'impact bactériologique du DON, les concentrations bactériennes dans les fèces de rats à flore humanisée ont été déduites par PCR en temps réel. Cette technique nous a permis de mettre en évidence des effets significatifs du DON sur l'abondance de certains groupes bactériens du MIH. Cette mycotoxine semble favoriser dans le cadre de notre étude, la croissance du groupe bactérien *Bacteroides/Prevotella*. Hors, ce groupe est impliqué dans le métabolisme des acides gras à chaîne courte. Il serait donc intéressant de doser ces composés afin de comparer leur évolution à celle des bactéries productrices et ainsi établir la signification biologique de ces changements (figure 23). Il pourrait être envisagé également d'approfondir et de caractériser ces changements à l'aide de techniques moléculaires beaucoup plus sophistiquées telles que le séquençage à haut débit. Cette technique pourra fournir des informations complémentaires aussi bien sur l'abondance des bactéries que sur la diversité de l'écosystème bactérien intestinal. En effet, bien que l'abondance des groupes bactériens ciblés ne soit pas modifiée, il est possible que la diversité ait changé au sein de ces mêmes groupes, modifiant les ratios des espèces bactériennes. La fonction de barrière du microbiote pourrait être évaluée en comparant la cinétique d'élimination d'une bactérie exogène, inoculée à des animaux MIH traités ou non avec du DON. Par la suite, il serait pertinent de surveiller, des espèces bactériennes reconnues pour leurs effets bénéfiques chez l'Homme. Par exemple, Sokol et ses collaborateurs (2008) ont identifié que *Faecalibacterium prausnitzii*, une bactérie intestinale, exerçait des effets anti-inflammatoires au niveau du tube digestif [247]. Sa faible prévalence dans de nombreux troubles intestinaux, en particulier chez les patients atteints de MICI, suggère un rôle potentiel dans l'homéostasie intestinale. Son rôle dans la santé a été détaillé et il a été proposé de surveiller l'abondance de cette bactérie comme bioindicateur de l'homéostasie intestinale [252].

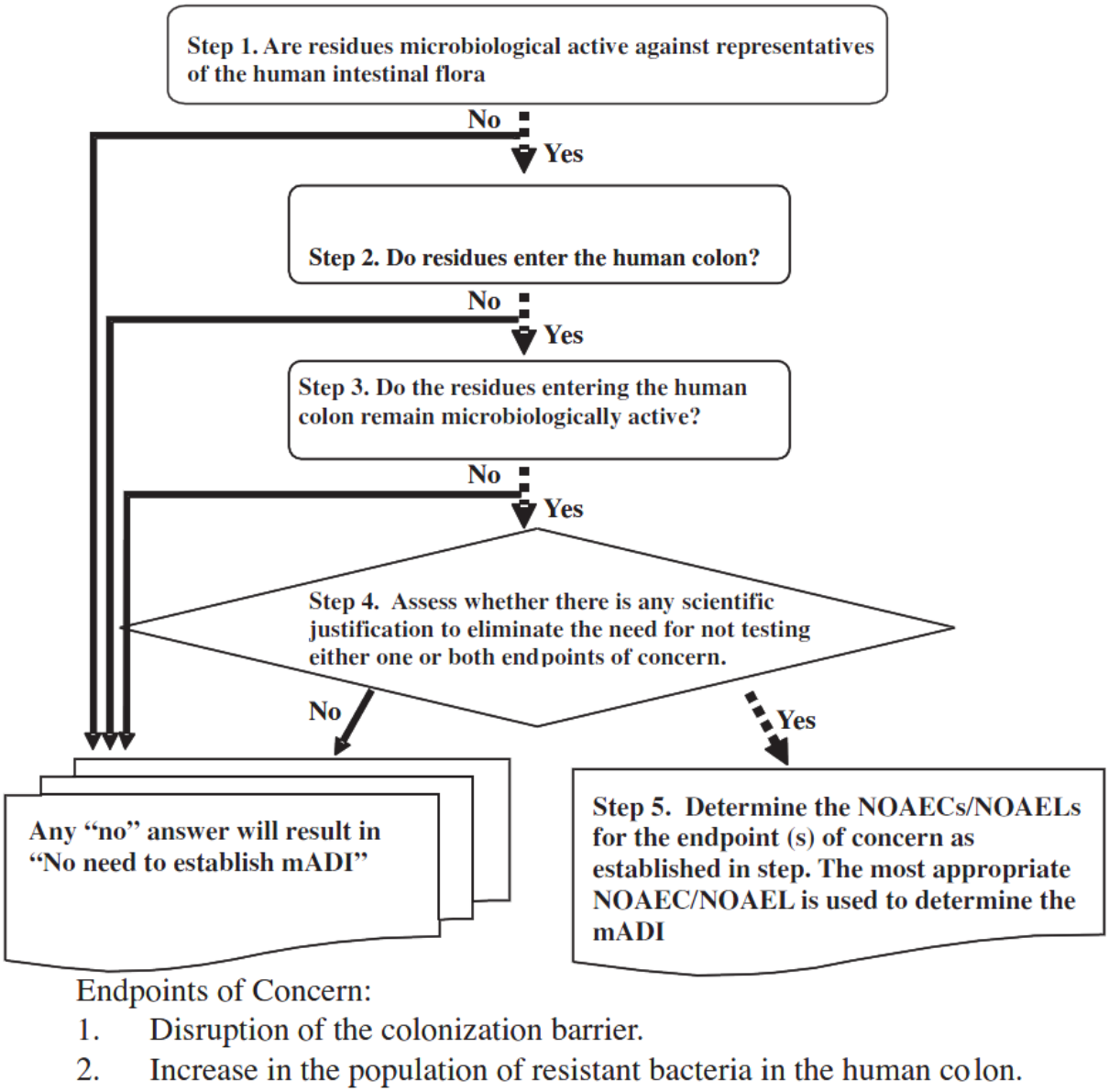


Figure 24 : Approche conceptuelle pour déterminer une dose microbiologique journalière admissible adaptée de la directive GL36 du VICH [253].

Les bifidobactéries et le groupe bactérien Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus n'ont pas été détectés dans nos conditions expérimentales. Ces bactéries sont connues pour leur capacité à fixer les molécules de DON sur leur paroi [120, 121]. L'absence de ces bactéries lactiques a peut-être contribué à augmenter la fraction de DON libre dans le tractus intestinal et donc aurait pu favoriser l'action du contaminant sur les autres bactéries intestinales.

Il faut signaler également que la biodisponibilité du DON chez le rat à flore humanisée pourrait être différente de celle que nous avons estimée chez le rat conventionnel et pourrait ainsi avoir une incidence sur l'impact de ce contaminant alimentaire.

Dans cette étude, nous avons démontré que la NOAEL toxicologique peut avoir un effet microbiologique significatif sur la composition du MIH. La NOAEL retenue, basée sur des résultats d'études toxicologiques, n'est donc pas sans effet sur l'organisme et la définition d'une NOAEL microbiologique semble nécessaire dans le cas du DON. Cette démarche existe déjà au sein de la directive GL36 établie par la Coopération internationale sur l'harmonisation des exigences techniques applicables à l'enregistrement des médicaments vétérinaires (VICH) (figure 24). Celle-ci propose en effet d'évaluer l'effet des résidus de médicaments vétérinaires antimicrobiens sur le MIH, pour déterminer une dose microbiologique journalière admissible (microbiological acceptable daily intake, mADI). Cette démarche pourrait être appliquée à l'ensemble des contaminants alimentaires et, au vue de nos constatations, nous suggérons plus généralement que l'effet des contaminants alimentaires sur le MIH fasse partie intégrante du processus d'évaluation des risques.

L'étude menée au cours de cette thèse visait à établir l'impact du déoxynivalénol sur le microbiote intestinal humain. Nous avons choisi d'inoculer des flores de donneurs humains à des rats axéniques. Ces donneurs étaient des adultes avec une alimentation de type occidental. Or, dans les enquêtes d'exposition au DON, les enfants de moins de 15 ans ont été classés parmi les populations à risque d'exposition élevée (tableau 7, figure 9). Il aurait donc été intéressant d'étudier l'impact du DON sur le microbiote intestinal de cette population. Néanmoins, les communautés microbiennes qui composent le microbiote des enfants sont soumises à de fortes variations supérieures à celles observées chez les adultes. Ceci a été observé dans les communautés rurales du Malawi et du Venezuela, ainsi que dans les populations américaines d'origine européenne et africaine [254]. De plus, les bifidobactéries constituent la population dominante du microbiote intestinal de l'enfant. Or, chez les rats à flore humanisée utilisés au cours cette étude, les bifidobactéries ont montré des difficultés à s'implanter (concentrations<LOD) dans le tractus digestif de notre modèle

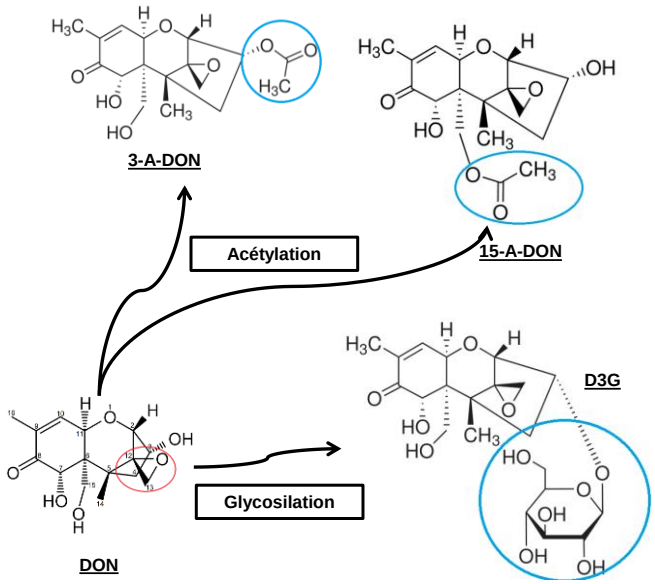


Figure 25 : Formes masquées du déoxynivalénol. DON : déoxynivalénol, 3-A-DON : 3 acétyle DON, 15-A-DON : 15 acétyle DON, D3G : DON-3-glucoside. Groupement principal responsable de la toxicité ; Groupement ajouté.

Tableau 12 : Études *in vitro* et *in vivo* mettant en évidence la transformation du D3G en DON.

Expériences	Modèle animal ou bactéries utilisés	Résultats	Références
In vivo	Porc	Hydrolyse du 3-A-DON en DON	[79]
in vitro	Bactéries intestinales (poulet)	Hydrolyse du 3-A-DON et du 15-A-DON en DON	[132]
in vitro	*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Enterobacter* et *Bifidobacterium* (intestin)	Hydrolyse du D3G en DON	[255]
In vivo	Rat	Hydrolyse du D3G en DON	[256]
In vitro	Microbiote intestinal humain	Hydrolyse du D3G en DON	[81]

alors qu'elles étaient présentes dans la flore des donneurs (10^8-10^{10} bactéries/g de fèces). Une étude pilote pourrait permettre de vérifier si le modèle de rats à flore humanisée est capable de reproduire le même microbiote intestinal que celui des enfants concernant notamment l'implantation des bifidobactéries.

Récemment, un problème émergent mis en avant, est le risque lié aux formes « masquées » du DON représentées dans la figure 25 [257]. Ces formes sont dites masquées car les dérivés formés sont indétectables par les techniques d'analyses classiquement utilisées pour le contrôle et la surveillance des mycotoxines. Ces formes masquées par des groupements acétylés ou glycosylés sont produites par la plante infectée (mécanisme de défense) ou par le champignon [258-260]. L'étude de l'alimentation totale (EAT 2) réalisée sur le territoire français en 2012 a établi que les dérivés acétylés représentent entre 0.1 et 10% de l'exposition moyenne au DON. Une étude récente a également montré que tous les échantillons de céréales contaminés par le DON contenaient également la forme glycosylée du DON (DON-3-glucoside, D3G) à des niveaux variant de 5 à 46% des teneurs en DON dans le maïs et le blé [261]. Plusieurs auteurs ont montré que sous l'action de certaines enzymes bactériennes, ces dérivés du DON pouvaient générer la molécule parent aussi bien en conditions *in vitro* qu'*in vivo* comme le résume le tableau 12. Cette capacité de libérer le DON est également retrouvé dans le microbiote intestinal humain, celui-ci étant capable d'hydrolyser le D3G très rapidement, avec en moyenne 80% de D3G hydrolysé après 4 h d'incubation [81]. D'après ces observations, le microbiote intestinal humain pourrait donc être exposé à des quantités de DON supérieure à celles estimées (figure 26). Par conséquent, les formes acétylées et glycosylées du DON devraient être prises en considération lors de la prochaine évaluation du risque associé à cette mycotoxine.

Pour conclure, la démarche utilisée au cours de cette thèse pourrait être élargie à d'autres types de contaminants alimentaires d'origines anthropique ou naturelle (mycotoxines, biocides, nanoparticules, …). Il conviendrait également d'étudier les interactions entre ces différents contaminants ainsi que leur co-occurrence afin d'évaluer les risques de multi-expositions.

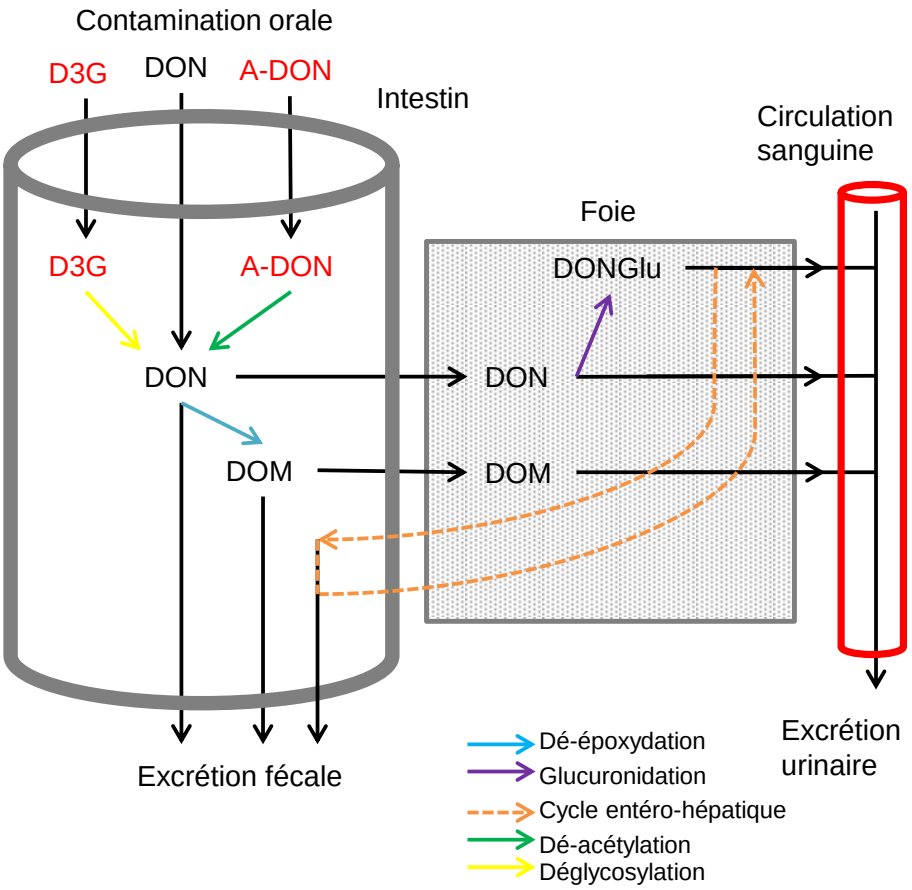


Figure 26 : Métabolisme du déoxynivalénol et de ses formes masquées dans l'organisme après une ingestion par voie orale. DON : déoxynivalénol, DOM : dé-époxy déoxynivalénol, DONGlu : DON glucuronide, D3G : DON-3-glucoside, A-DON : dérivés acétylés du DON. En rouges les formes masquées du DON.

Références

1. Schatzmayr, G. and E. Streit, *Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: Facts and figures.* World Mycotoxin Journal, 2013. **6**(3): p. 213-222.
2. Wu, F., *Measuring the economic impacts of Fusarium toxins in animal feeds.* Animal Feed Science and Technology, 2007. **137**(3): p. 363-374.
3. Bhatnagar, D., J. Yu, and K.C. Ehrlich, *Toxins of filamentous fungi*, in *Fungal Allergy and Pathogenicity*. 2002. p. 167-206.
4. Miller, J., *Global significance of mycotoxins.* Mycotoxins and Phycotoxins–Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety Alaken Inc., Ford Collins, Colorado, 1998: p. 3-15.
5. Robbana-Barnat, S., C. Lafarge-Frayssinet, and C. Frayssinet, *Use of cell cultures for predicting the biological effects of mycotoxins.* Cell Biology and Toxicology, 1989. **5**(2): p. 217-226.
6. Beardall, J., J. Miller, and H. Trenholm, *Diseases in humans with mycotoxins as possible causes*, in *Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin.* 1994. p. 487-539.
7. Coulombe Jr, R.A., *Biological action of mycotoxins.* Journal of Dairy Science, 1993. **76**(3): p. 880-891.
8. Lammerding, A.M. and A. Fazil, *Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment.* International Journal of Food Microbiology, 2000. **58**(3): p. 147-157.
9. Goswami, R.S. and H.C. Kistler, *Heading for disaster: Fusarium graminearum on cereal crops.* Molecular Plant Pathology, 2004. **5**(6): p. 515-525.
10. Logrieco, A., et al., *Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe.* European Journal of Plant Pathology, 2002. **108**(7): p. 597-609.
11. Miller, J.D., *Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research.* Journal of Stored Products Research, 1995. **31**(1): p. 1-16.
12. Muriuki, G. and C. Mirocha, *Time of deoxynivalenol and nivalenol biosynthesis during pathogenesis of Fusarium species in wheat.* Mitteilungen biologischen bundesanstalt für land und forstwirtschaft, 2000: p. 48-48.
13. Stack, R., K. Leonard, and W. Bushnell, *History of Fusarium head blight with emphasis on North America.* Fusarium head blight of wheat and barley, 2003: p. 1-34.
14. Stack, R.W., *Return of an old problem: Fusarium head blight of small grains.* APSnet Plant Health Reviews, 2000.
15. Bottalico, A., *Fusarium diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe.* Journal of Plant Pathology, 1998. **80**(2): p. 85-103.
16. Xu, X., *Effects of environmental conditions on the development of Fusarium ear blight.* European Journal of Plant Pathology, 2003. **109**(7): p. 683-689.
17. Abouzied, M., et al., *Immunochemical assessment of mycotoxins in 1989 grain foods: evidence for deoxynivalenol (vomitoxin) contamination.* Applied and Environmental Microbiology, 1991. **57**(3): p. 672-677.
18. Malmauret, L., et al., *Contaminants in organic and conventional foodstuffs in France.* Food Additives & Contaminants, 2002. **19**(6): p. 524-532.
19. Tanaka, T., et al., *Worldwide contamination of cereals by the Fusarium mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone. 1. Survey of 19 countries.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1988. **36**(5): p. 979-983.
20. Binder, E.M., et al., *Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients.* Animal Feed Science and Technology, 2007. **137**(3-4): p. 265-282.
21. Lawlor, P. and P. Lynch, *Mycotoxin management.* African Farming and Food Processing, 2005. **46**: p. 12-13.

22. Placinta, C., J. D'mello, and A. Macdonald, *A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins.* Animal Feed Science and Technology, 1999. **78**(1): p. 21-37.
23. Sobrova, P., et al., *Deoxynivalenol and its toxicity.* Interdisciplinary toxicology, 2010. **3**(3): p. 94-99.
24. Betina, V., *Structure-activity relationships among mycotoxins.* Chemico-Biological Interactions, 1989. **71**(2): p. 105-146.
25. Sundstøl Eriksen, G., H. Pettersson, and T. Lundh, *Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites.* Food and Chemical Toxicology, 2004. **42**(4): p. 619-624.
26. Anselme, M., et al., *Comparison of ochratoxin A and deoxynivalenol in organically and conventionally produced beers sold on the Belgian market.* Food Additives and Contaminants, 2006. **23**(9): p. 910-918.
27. Biselli, S. and C. Hummert, *Development of a multicomponent method for Fusarium toxins using LC-MS/MS and its application during a survey for the content of T-2 toxin and deoxynivalenol in various feed and food samples.* Food Additives and Contaminants, 2005. **22**(8): p. 752-760.
28. Castillo, M.-Á., et al., *Occurrence of deoxynivalenol and nivalenol in Spanish corn-based food products.* Journal of Food Composition and Analysis, 2008. **21**(5): p. 423-427.
29. Wood, G., *Mycotoxins in foods and feeds in the United States.* Journal of Animal Science, 1992. **70**(12): p. 3941-3949.
30. Wolf, C.E. and L.B. Bullerman, *Heat and pH alter the concentration of deoxynivalenol in an aqueous enviroment.* Journal of Food Protection®, 1998. **61**(3): p. 365-367.
31. Wolf-Hall, C.E., M.A. Hanna, and L.B. Bullerman, *Stability of deoxynivalenol in heat-treated foods.* Journal of Food Protection®, 1999. **62**(8): p. 962-964.
32. Ehrlich, K.C. and K.W. Daigle, *Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12, 13-epoxytrichothecenes.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1987. **923**(2): p. 206-213.
33. Iordanov, M.S., et al., *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.* Molecular and cellular biology, 1997. **17**(6): p. 3373-3381.
34. Laskin, J.D., D.E. Heck, and D.L. Laskin, *The ribotoxic stress response as a potential mechanism for MAP kinase activation in xenobiotic toxicity.* Toxicological Sciences, 2002. **69**(2): p. 289-291.
35. Luo, X., *Outbreaks of moldy cereals poisoning in China.* Issues in food safety, 1988: p. 56-63.
36. Bhat, R., et al., *Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat production in Kashmir Valley, India.* The Lancet, 1989. **333**(8628): p. 35-37.
37. Luo, X. *Food poisoning caused by Fusarium toxins*. in *Proceedings of the Second Asian Conference on Food Safety. Chatuchak, Thailand: International Life Sciences Institute*. 1994.
38. Hsia, C., et al., *Natural occurrence and clastogenic effects of nivalenol, deoxynivalenol, 3-acetyl-deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol, and zearalenone in corn from a high-risk area of esophageal cancer.* Cancer detection and prevention, 1987. **13**(2): p. 79-86.
39. Luo, Y., T. Yoshizawa, and T. Katayama, *Comparative study on the natural occurrence of Fusarium mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high-and low-risk areas for human esophageal cancer in China.* Applied and Environmental Microbiology, 1990. **56**(12): p. 3723-3726.

40. Ran, R., et al., *Determination of deoxynivalenol (DON) and its derivatives: Current status of analytical methods.* Food Control, 2013. **34**(1): p. 138-148.
41. De Baere, S., et al., *Quantitative determination of T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol and deepoxy-deoxynivalenol in animal body fluids using LC–MS/MS detection.* Journal of Chromatography B, 2011. **879**(24): p. 2403-2415.
42. Devreese, M., et al., *Quantitative determination of several toxicological important mycotoxins in pig plasma using multi-mycotoxin and analyte-specific high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods.* Journal of Chromatography A, 2012. **1257**: p. 74-80.
43. Malik, A.K., C. Blasco, and Y. Picó, *Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety.* Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(25): p. 4018-4040.
44. Songsermsakul, P. and E. Razzazi-Fazeli, *A review of recent trends in applications of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of mycotoxins.* Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies®, 2008. **31**(11-12): p. 1641-1686.
45. Maresca, M., *From the Gut to the Brain: Journey and Pathophysiological Effects of the Food-Associated Trichothecene Mycotoxin Deoxynivalenol.* Toxins, 2013. **5**(4): p. 784-820.
46. Pestka, J.J. and A.T. Smolinski, *Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans.* Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 2005. **8**(1): p. 39-69.
47. Pestka, J.J., *Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks.* Animal Feed Science and Technology, 2007. **137**(3-4): p. 283-298.
48. Rotter, B.A., *Toxicology of Deoxynivalenol (Vomitoxin).* Journal of Toxicology and Environmental Health, 1996. **48**(1): p. 1-34.
49. Maresca, M., et al., *The Mycotoxin Deoxynivalenol Affects Nutrient Absorption in Human Intestinal Epithelial Cells.* The Journal of Nutrition, 2002. **132**(9): p. 2723-2731.
50. Instanes, C. and G. Hetland, *Deoxynivalenol (DON) is toxic to human colonic, lung and monocytic cell lines, but does not increase the IgE response in a mouse model for allergy.* Toxicology, 2004. **204**(1): p. 13-21.
51. Diesing, A.-K., et al., *Vulnerability of Polarised Intestinal Porcine Epithelial Cells to Mycotoxin Deoxynivalenol Depends on the Route of Application.* PLoS ONE, 2011. **6**(2): p. e17472.
52. Vandenbroucke, V., et al., *The Mycotoxin Deoxynivalenol Potentiates Intestinal Inflammation by <italic>Salmonella</italic> Typhimurium in Porcine Ileal Loops.* PLoS ONE, 2011. **6**(8): p. e23871.
53. Awad, W., et al., *In vitro effects of deoxynivalenol on small intestinal D-glucose uptake and absorption of deoxynivalenol across the isolated jejunal epithelium of laying hens.* Poultry Science, 2007. **86**(1): p. 15-20.
54. Hunder, G., et al., *Influence of subchronic exposure to low dietary deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, on intestinal absorption of nutrients in mice.* Food and Chemical Toxicology, 1991. **29**(12): p. 809-814.
55. Pinton, P., et al., *Toxicity of deoxynivalenol and its acetylated derivatives on the intestine: Differential effects on morphology, barrier function, tight junction proteins, and mitogen-activated protein kinases.* Toxicological Sciences, 2012. **130**(1): p. 180-190.
56. Pestka, J., et al., *Elevated membrane IgA$^+$ and CD4$^+$ (T helper) populations in murine peyer's patch and splenic lymphocytes during dietary administration of the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol).* Food and Chemical Toxicology, 1990. **28**(6): p. 409-420.
57. Tryphonas, H., F. Iverson, and Y. So, *Effects of deoxynivalenol (vomitoxin) on the humoral and cellular immunity of mice.* Toxicology Letters, 1986. **30**(2): p. 137-150.

58. Berek, L., et al., *Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro.* Toxicology in Vitro, 2001. **15**(1): p. 25-30.
59. Pestka, J.J., et al., *Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox.* Toxicology Letters, 2004. **153**(1): p. 61-73.
60. Goyarts, T., et al., *Effect of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) on IgA, IgM and IgG concentrations and proliferation of porcine blood lymphocytes.* Toxicology in Vitro, 2006. **20**(6): p. 858-867.
61. Pestka, J.J., *Deoxynivalenol-induced proinflammatory gene expression: Mechanisms and pathological sequelae.* Toxins, 2010. **2**(6): p. 1300-1317.
62. Atkinson, H.A.C. and K. Miller, *Inhibitory effect of deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and zearalenone on induction of rat and human lymphocyte proliferation.* Toxicology Letters, 1984. **23**(2): p. 215-221.
63. Zain, M.E., *Impact of mycotoxins on humans and animals.* Journal of Saudi Chemical Society, 2011. **15**(2): p. 129-144.
64. Yoshizawa, T. and N. Morooka, *Studies on the toxic substances in the infected cereals, 3: Acute toxicities of new trichothecene mycotoxins: Deoxynivalenol and its monoacetate.* Journal of the Food Hygienic Society of Japan, 1974. **15**.
65. Forsyth, D., et al., *Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine.* Applied and Environmental Microbiology, 1977. **34**(5): p. 547-552.
66. Pestka, J., W.-S. Lin, and E. Miller, *Emetic activity of the trichothecene 15-acetyldeoxynivalenol in swine.* Food and Chemical Toxicology, 1987. **25**(11): p. 855-858.
67. Prelusky, D.B. and H.L. Trenholm, *The efficacy of various classes of anti-emetics in preventing deoxynivalenol-induced vomiting in swine.* Natural Toxins, 1993. **1**(5): p. 296-302.
68. Iverson, F., et al., *Chronic Feeding Study of deoxynivalenol in B6C3F1 male and female mice.* Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, 1995. **15**(6): p. 283-306.
69. Arnold, D.L., et al., *A Short-Term Feeding Study with Deoxynivalenol (Vomitoxin) Using Rats.* Toxicological Sciences, 1986. **6**(4): p. 691-696.
70. Azcona-olivera, J.I., et al., *Induction of cytokine mRNAs in mice after oral exposure to the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol): relationship to toxin distribution and protein synthesis inhibition.* Toxicology and Applied Pharmacology, 1995. **133**(1): p. 109-120.
71. Yordanova, P., Z. Islam, and J. Pestka, *Kinetics of deoxynivalenol (vomitoxin) distribution and clearance following oral exposure in the mouse.* Toxicologist, 2003. **72**: p. 253-253.
72. Côté, L.M., et al., *Excretion of Deoxynivalenol and Its Metabolite in Milk, Urine, and Feces of Lactating Dairy Cows.* Journal of Dairy Science, 1986. **69**(9): p. 2416-2423.
73. Prelusky, D.B., D.M. Veira, and H.L. Trenholm, *Plasma pharmacokinetics of the mycotoxin deoxynivalenol following oral and intravenous administration to sheep.* Journal of Environmental Science and Health, Part B, 1985. **20**(6): p. 603-624.
74. Prelusky, D.B., et al., *Excretion profiles of the mycotoxin deoxynivalenol, following oral and intravenous administration to sheep.* Fundamental and Applied Toxicology, 1986. **6**(2): p. 356-363.
75. Osselaere, A., et al., *Toxicokinetic study and absolute oral bioavailability of deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone in broiler chickens.* Food and Chemical Toxicology, 2013. **51**(1): p. 350-355.
76. Goyarts, T. and S. Dänicke, *Bioavailability of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig.* Toxicology Letters, 2006. **163**(3): p. 171-182.

77. Prelusky, D., et al., *Pharmacokinetic fate of ^{14}C-labeled deoxynivalenol in swine.* Fundamental and Applied Toxicology, 1988. **10**(2): p. 276-286.
78. Dänicke, S., H. Valenta, and S. Döll, *On the toxicokinetics and the metabolism of deoxynivalenol (DON) in the pig.* Archives of animal nutrition, 2004. **58**(2): p. 169-180.
79. Eriksen, G.S., H. Pettersson, and J. Lindberg, *Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs.* Archives of animal nutrition, 2003. **57**(5): p. 335-345.
80. Prelusky, D.B. and H.L. Trenholm, *Tissue distribution of deoxynivalenol in swine dosed intravenously.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991. **39**(4): p. 748-751.
81. Gratz, S.W., G. Duncan, and A.J. Richardson, *The human fecal microbiota metabolizes deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside and may be responsible for urinary deepoxy-deoxynivalenol.* Applied and Environmental Microbiology, 2013. **79**(6): p. 1821-1825.
82. Lattanzio, V.M.T., et al., *LC–MS/MS characterization of the urinary excretion profile of the mycotoxin deoxynivalenol in human and rat.* Journal of Chromatography B, 2011. **879**(11–12): p. 707-715.
83. Turner, P.C., et al., *Assessment of deoxynivalenol metabolite profiles in UK adults.* Food and Chemical Toxicology, 2011. **49**(1): p. 132-135.
84. Turner, P.C., et al., *Urinary deoxynivalenol is correlated with cereal intake in individuals from the United Kingdom.* Environmental Health Perspectives, 2008. **116**(1): p. 21-25.
85. Warth, B., et al., *New insights into the human metabolism of the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone.* Toxicology Letters, 2013. **220**(1): p. 88-94.
86. Maul, R., et al., *Investigation of the hepatic glucuronidation pattern of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in various species.* Chemical research in toxicology, 2012. **25**(12): p. 2715-2717.
87. Valenta, H. and S. Dänicke, *Study on the transmission of deoxynivalenol and de-epoxy-deoxynivalenol into eggs of laying hens using a high-performance liquid chromatography-ultraviolet method with clean-up by immunoaffinity columns.* Molecular Nutrition & Food Research, 2005. **49**(8): p. 779-785.
88. Lake, B.G., et al., *Studies on the metabolism of deoxynivalenol in the rat.* Food and Chemical Toxicology, 1987. **25**(8): p. 589-592.
89. Prelusky, D., et al., *Nontransmission of deoxynivalenol (vomitoxin) to milk following oral administration to dairy cows.* Journal of Environmental Science & Health Part B, 1984. **19**(7): p. 593-609.
90. Turner, P.C., et al., *Determinants of Urinary Deoxynivalenol and De-epoxy Deoxynivalenol in Male Farmers from Normandy, France.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(8): p. 5206-5212.
91. Sirot, V., J.-M. Fremy, and J.-C. Leblanc, *Dietary exposure to mycotoxins and health risk assessment in the second French total diet study.* Food and Chemical Toxicology, 2013. **52**(0): p. 1-11.
92. 51-2003, C.R., *Code of practice for the prevention and reduction of mycotoxin contamination in cereals, including annexes on ochratoxin A, zearalenone, fumonisins and trichothecenes*, 2003.
93. Yuen, G.Y. and S.D. Schoneweis, *Strategies for managing Fusarium head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat.* International Journal of Food Microbiology, 2007. **119**(1-2): p. 126-130.
94. Dill-Macky, R. and R. Jones, *The effect of previous crop residues and tillage on Fusarium head blight of wheat.* Plant disease, 2000. **84**(1): p. 71-76.
95. Edwards, S.G., *Influence of agricultural practices on Fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins.* Toxicology Letters, 2004. **153**(1): p. 29-35.

96. McMullen, M., R. Jones, and D. Gallenberg, *Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact.* Plant disease, 1997. **81**(12): p. 1340-1348.
97. Nakajima, T., M. Yoshida, and K. Tomimura, *Effect of lodging on the level of mycotoxins in wheat, barley, and rice infected with the Fusarium graminearum species complex.* Journal of General Plant Pathology, 2008. **74**(4): p. 289-295.
98. Yoshida, M. and T. Nakajima, *Deoxynivalenol and nivalenol accumulation in wheat infected with Fusarium graminearum during grain development.* Phytopathology, 2010. **100**(8): p. 763-773.
99. Liu, S., et al., *Molecular characterization of field resistance to Fusarium head blight in two US soft red winter wheat cultivars.* Theoretical and Applied Genetics, 2013. **126**(10): p. 2485-2498.
100. Gervais, L., et al., *Mapping of quantitative trait loci for field resistance to Fusarium head blight in an European winter wheat.* Theoretical and Applied Genetics, 2003. **106**(6): p. 961-970.
101. Kabak, B. and A.D. Dobson, *Biological strategies to counteract the effects of mycotoxins.* Journal of Food Protection®, 2009. **72**(9): p. 2006-2016.
102. Khan, M.R. and F.M. Doohan, *Bacterium-mediated control of Fusarium head blight disease of wheat and barley and associated mycotoxin contamination of grain.* Biological Control, 2009. **48**(1): p. 42-47.
103. Palazzini, J.M., et al., *Potential biocontrol agents for Fusarium head blight and deoxynivalenol production in wheat.* Crop Protection, 2007. **26**(11): p. 1702-1710.
104. Moschini, R. and C. Fortugno, *Predicting wheat head blight incidence using models based on meteorological factors in Pergamino, Argentina.* European Journal of Plant Pathology, 1996. **102**(3): p. 211-218.
105. Musa, T., et al. *Forecasting of Fusarium head blight and deoxynivalenol content in winter wheat with FusaProg*. in *EPPO Bulletin*. 2007.
106. Prandini, A., et al., *Review of predictive models for Fusarium head blight and related mycotoxin contamination in wheat.* Food and Chemical Toxicology, 2009. **47**(5): p. 927-931.
107. Rossi, V., et al. *A model estimating the risk of Fusarium head blight on wheat*. in *EPPO Bulletin*. 2003.
108. Van Der Fels-Klerx, H., S.L. Burgers, and C. Booij, *Descriptive modelling to predict deoxynivalenol in winter wheat in the Netherlands.* Food Additives and Contaminants, 2010. **27**(5): p. 636-643.
109. Van der Fels-Klerx, H.J., *Evaluation of performance of predictive models for deoxynivalenol in wheat.* Risk Analysis, 2013.
110. Magan, N. and D. Aldred, *Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain.* International Journal of Food Microbiology, 2007. **119**(1): p. 131-139.
111. Awad, W.A., et al., *Decontamination and detoxification strategies for the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation.* Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, 2010. **27**(4): p. 510-520.
112. Kabak, B., A.D. Dobson, and I.l. Var, *Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2006. **46**(8): p. 593-619.
113. Fuchs, E., et al., *Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797.* Food Additives and Contaminants, 2002. **19**(4): p. 379-386.
114. Guan, S., et al., *Transformation of trichothecene mycotoxins by microorganisms from fish digesta.* Aquaculture, 2009. **290**(3-4): p. 290-295.
115. Cheng, B., et al., *Detoxification of Deoxynivalenol by Bacillus Strains.* Journal of Food Safety, 2010. **30**(3): p. 599-614.

116. Shima, J., et al., *Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol by a soil bacterium isolated by enrichment culture.* Applied and Environmental Microbiology, 1997. **63**(10): p. 3825-30.
117. Yu, H., et al., *Isolation of deoxynivalenol-transforming bacteria from the chicken intestines using the approach of PCR-DGGE guided microbial selection.* BMC Microbiology, 2010. **10**(1): p. 182.
118. Islam, R., et al., *Aerobic and anaerobic de-epoxydation of mycotoxin deoxynivalenol by bacteria originating from agricultural soil.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012. **28**(1): p. 7-13.
119. Sato, I., et al., *Thirteen novel deoxynivalenol-degrading bacteria are classified within two genera with distinct degradation mechanisms.* FEMS Microbiology Letters, 2012. **327**(2): p. 110-117.
120. Franco, T.S., et al., *Lactic acid bacteria in the inhibition of Fusarium graminearum and deoxynivalenol detoxification.* Journal of Applied Microbiology, 2011. **111**(3): p. 739-748.
121. El-Nezami, H.S., et al., *Removal of common Fusarium toxins in vitro by strains of Lactobacillus and Propionibacterium.* Food Additives and Contaminants, 2002. **19**(7): p. 680 - 686.
122. Niderkorn, V., et al., *Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an in vitro simulated corn silage model.* Food Additives and Contaminants, 2007. **24**(4): p. 406-415.
123. Ikunaga, Y., et al., *Nocardioides sp. strain WSN05-2, isolated from a wheat field, degrades deoxynivalenol, producing the novel intermediate 3-epi-deoxynivalenol.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2011. **89**(2): p. 419-427.
124. He, P., L.G. Young, and C. Forsberg, *Microbial transformation of deoxynivalenol (vomitoxin).* Applied and Environmental Microbiology, 1992. **58**(12): p. 3857-3863.
125. Zhou, T., J. He, and J. Gong, *Microbial transformation of trichothecene mycotoxins.* World Mycotoxin Journal, 2008. **1**(1): p. 23-30.
126. King, R.R., et al., *Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1984. **32**(5): p. 1181-1183.
127. Worrell, N., et al., *The role of gut micro-organisms in the metabolism of deoxynivalenol administered to rats.* Xenobiotica, 1989. **19**(1): p. 25-32.
128. Westlake, K., R.I. Mackie, and M.F. Dutton, *In vitro metabolism of mycotoxins by bacterial, protozoal and ovine ruminal fluid preparations.* Animal Feed Science and Technology, 1989. **25**(1-2): p. 169-178.
129. Lun, A., et al., *Disappearance of deoxynivalenol from digesta progressing along the chicken's gastrointestinal tract after intubation with feed containing contaminated corn.* Bulletin of environmental contamination and toxicology, 1988. **40**(3): p. 317-324.
130. Kollarczik, B., M. Gareis, and M. Hanelt, *In vitro transformation of the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone by the normal gut microflora of pigs.* Natural Toxins, 1994. **2**(3): p. 105-110.
131. Eriksen, G., et al., *Transformation of trichothecenes in ileal digesta and faeces from pigs.* Archives of animal nutrition, 2002. **56**(4): p. 263-274.
132. Young, J.C., et al., *Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes.* Food and Chemical Toxicology, 2007. **45**(1): p. 136-143.
133. Sundstøl, E., G. and H. Pettersson, *Lack of de-epoxidation of type B trichothecenes in incubates with human faeces.* Food Additives and Contaminants, 2003. **20**(6): p. 579-582.
134. He, J., et al., *Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review.* Trends in Food Science & Technology, 2010. **21**(2): p. 67-76.

135. Awad, W., et al., *Effect of addition of a probiotic microorganism to broiler diets contaminated with deoxynivalenol on performance and histological alterations of intestinal villi of broiler chickens.* Poultry Science, 2006. **85**(6): p. 974-979.
136. Schatzmayr, G., et al., *Microbiologicals for deactivating mycotoxins.* Molecular Nutrition and Food Research, 2006. **50**(6): p. 543-551.
137. Karlovsky, P., *Biological detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol and its use in genetically engineered crops and feed additives.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2011. **91**(3): p. 491-504.
138. Jeong, J.S., et al., *Effects of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol on in vitro rumen fermentation.* Animal Feed Science and Technology, 2010. **162**(3–4): p. 144-148.
139. Westlake, K., R.I. Mackie, and M.F. Dutton, *Effects of several mycotoxins on specific growth rate of Butyrivibrio fibrisolvens and toxin degradation in vitro.* Applied and Environmental Microbiology, 1987. **53**(3): p. 613-614.
140. Madhyastha, M., et al., *Comparison of toxicity of different mycotoxins to several species of bacteria and yeasts: use of Bacillus brevis in a disc diffusion assay.* Journal of Food Protection®, 1994. **57**(1): p. 48-53.
141. Waché, Y., et al., *Impact of Deoxynivalenol on the Intestinal Microflora of Pigs.* International Journal of Molecular Sciences, 2008. **10**(1): p. 1-17.
142. Dave, M., et al., *The human gut microbiome: Current knowledge, challenges, and future directions.* Translational Research, 2012. **160**(4): p. 246-257.
143. Sartor, R.B., *Microbial influences in inflammatory bowel diseases.* Gastroenterology, 2008. **134**(2): p. 577-594.
144. Ley, R.E., D.A. Peterson, and J.I. Gordon, *Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine.* Cell, 2006. **124**(4): p. 837-848.
145. Hooper, L.V. and J.I. Gordon, *Commensal host-bacterial relationships in the gut.* Science, 2001. **292**(5519): p. 1115-1118.
146. Whitman, W.B., D.C. Coleman, and W.J. Wiebe. *Prokaryotes: the unseen majority*. in *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998.
147. Eckburg, P.B., et al., *Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora.* Science, 2005. **308**(5728): p. 1635-1638.
148. Frank, D.N. and N.R. Pace, *Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era.* Current opinion in gastroenterology, 2008. **24**(1): p. 4-10.
149. Qin, J., et al., *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing.* Nature, 2010. **464**(7285): p. 59-65.
150. Turnbaugh, P.J., et al., *The human microbiome project.* Nature, 2007. **449**(7164): p. 804-810.
151. Sghir, A., et al., *Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization.* Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(5): p. 2263-2266.
152. Parfrey, L.W., W.A. Walters, and R. Knight, *Microbial eukaryotes in the human microbiome: ecology, evolution, and future directions.* Frontiers in Microbiology, 2011. **2**.
153. Scanlan, P.D. and J.R. Marchesi, *Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and-independent analysis of faeces.* The ISME Journal, 2008. **2**(12): p. 1183-1193.
154. Ghannoum, M.A., et al., *Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals.* PLoS pathogens, 2010. **6**(1): p. e1000713.
155. Marchesi, J.R., *Prokaryotic and eukaryotic diversity of the human gut.* Advances in applied microbiology, 2010. **72**: p. 43-62.
156. Prakash, S., et al., *Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics.* Biologics: targets and therapy, 2011. **5**: p. 71.
157. Breitbart, M., et al., *Viral diversity and dynamics in an infant gut.* Research in Microbiology, 2008. **159**(5): p. 367-373.

158. Haynes, M. and F. Rohwer, *The human virome*, in *Metagenomics of the Human Body*. 2011, Springer. p. 63-77.
159. Reyes, A., et al., *Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers.* Nature, 2010. **466**(7304): p. 334-338.
160. Guarner, F. and J.-R. Malagelada, *Gut flora in health and disease.* The Lancet, 2003. **361**(9356): p. 512-519.
161. Wong, J.M., et al., *Colonic health: fermentation and short chain fatty acids.* Journal of clinical gastroenterology, 2006. **40**(3): p. 235-243.
162. Sekirov, I., et al., *Gut microbiota in health and disease.* Physiological Reviews, 2010. **90**(3): p. 859-904.
163. Angelakis, E., et al., *The relationship between gut microbiota and weight gain in humans.* Future Microbiology, 2011. **7**(1): p. 91-109.
164. Xu, J., et al., *A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis.* Science, 2003. **299**(5615): p. 2074-2076.
165. Lefebvre, P., et al., *Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation.* Physiological Reviews, 2009. **89**(1): p. 147-191.
166. Salminen, S., et al., *Functional food science and gastrointestinal physiology and function.* British Journal of Nutrition, 1998. **80**(1): p. S147.
167. Stappenbeck, T.S., L.V. Hooper, and J.I. Gordon. *Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells*. in *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002.
168. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease.* Nature Reviews Immunology, 2009. **9**(5): p. 313-323.
169. Lee, Y.K. and S.K. Mazmanian, *Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system?* Science, 2010. **330**(6012): p. 1768-1773.
170. Round, J.L. and S.K. Mazmanian. *Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota*. in *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010.
171. O'Mahony, C., et al., *Commensal-induced regulatory T cells mediate protection against pathogen-stimulated NF-κB activation.* PLoS pathogens, 2008. **4**(8): p. e1000112.
172. Mazmanian, S.K., et al., *An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system.* Cell, 2005. **122**(1): p. 107-118.
173. Christensen, H.R., H. Frøkiær, and J.J. Pestka, *Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells.* The Journal of Immunology, 2002. **168**(1): p. 171-178.
174. Lawley, T.D. and A.W. Walker, *Intestinal colonization resistance.* Immunology, 2013. **138**(1): p. 1-11.
175. Wilson, K.H. and F. Perini, *Role of competition for nutrients in suppression of Clostridium difficile by the colonic microflora.* Infection and immunity, 1988. **56**(10): p. 2610-2614.
176. Gantois, I., et al., *Butyrate specifically down-regulates Salmonella pathogenicity island 1 gene expression.* Applied and Environmental Microbiology, 2006. **72**(1): p. 946-949.
177. Cherrington, C.A., et al., *Short-chain organic acids at pH 5.0 kill Escherichia coli and Salmonella spp. without causing membrane perturbation.* Journal of Applied Microbiology, 1991. **70**(2): p. 161-165.
178. Gong, H.S., X.C. Meng, and H. Wang, *Mode of action of plantaricin MG, a bacteriocin active against Salmonella typhimurium.* Journal of Basic Microbiology, 2010. **50**(S1): p. S37-S45.

179. Rea, M.C., et al. *Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against Clostridium difficile*. in *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010.
180. Marteyn, B., et al., *Modulation of Shigella virulence in response to available oxygen in vivo.* Nature, 2010. **465**(7296): p. 355-358.
181. Fraher, M.H., P.W. O'Toole, and E.M.M. Quigley, *Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician.* Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 2012.
182. Nadal, I., et al., *Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease.* Journal of Medical Microbiology, 2007. **56**(12): p. 1669-1674.
183. Rigottier-Gois, L., et al., *Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes.* FEMS Microbiology Ecology, 2003. **43**(2): p. 237-245.
184. Candela, M., et al., *Functional intestinal microbiome, new frontiers in prebiotic design.* International Journal of Food Microbiology, 2010. **140**(2-3): p. 93-101.
185. Paliy, O. and R. Agans, *Application of phylogenetic microarrays to interrogation of human microbiota.* FEMS Microbiology Ecology, 2012. **79**(1): p. 2-11.
186. Rigsbee, L., et al., *Optimizing the analysis of human intestinal microbiota with phylogenetic microarray.* FEMS Microbiology Ecology, 2011. **75**(2): p. 332-342.
187. Bergström, A., et al., *Introducing GUt Low-Density Array (GULDA) – a validated approach for qPCR-based intestinal microbial community analysis.* FEMS Microbiology Letters, 2012: p. 38-47.
188. DeAngelis, K.M., et al., *PCR Amplification-Independent Methods for Detection of Microbial Communities by the High-Density Microarray PhyloChip.* Applied and Environmental Microbiology, 2011. **77**(18): p. 6313-6322.
189. Rajilić-Stojanović, M., et al., *Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults.* Environmental Microbiology, 2009. **11**(7): p. 1736-1751.
190. Tottey, W., et al., *The Human Gut Chip "HuGChip", an Explorative Phylogenetic Microarray for Determining Gut Microbiome Diversity at Family Level.* PLoS ONE, 2013. **8**(5).
191. Bartosch, S., et al., *Characterization of Bacterial Communities in Feces from Healthy Elderly Volunteers and Hospitalized Elderly Patients by Using Real-Time PCR and Effects of Antibiotic Treatment on the Fecal Microbiota.* Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(6): p. 3575-3581.
192. Mariat, D., et al., *The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age.* BMC Microbiology, 2009. **9**(1): p. 123.
193. Sokol, H., et al., *Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota.* Inflammatory Bowel Diseases, 2009. **15**(8): p. 1183-1189.
194. Jalanka-Tuovinen, J., et al., *Intestinal Microbiota in Healthy Adults: Temporal Analysis Reveals Individual and Common Core and Relation to Intestinal Symptoms.* PLoS ONE, 2011. **6**(7): p. e23035.
195. Ponnusamy, K., et al., *Microbial community and metabolomic comparison of irritable bowel syndrome faeces.* Journal of Medical Microbiology, 2011. **60**(6): p. 817-827.
196. Zwielehner, J., et al., *Combined PCR-DGGE fingerprinting and quantitative-PCR indicates shifts in fecal population sizes and diversity of Bacteroides, bifidobacteria and Clostridium cluster IV in institutionalized elderly.* Experimental Gerontology, 2009. **44**(6-7): p. 440-446.
197. Bacchetti De Gregoris, T., et al., *Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa.* Journal of Microbiological Methods, 2011. **86**(3): p. 351-356.

198. Blackwood, C.B., A. Oaks, and J.S. Buyer, *Phylum- and Class-Specific PCR Primers for General Microbial Community Analysis.* Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71**(10): p. 6193-6198.
199. Maron, P.-A., et al., *Metaproteomics: A New Approach for Studying Functional Microbial Ecology.* Microbial Ecology, 2007. **53**(3): p. 486-493.
200. Zhang, H., et al. *Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass*. in *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009.
201. Feinberg, M., *Validation of analytical methods based on accuracy profiles.* Journal of Chromatography A, 2007. **1158**(1–2): p. 174-183.
202. ISO, E., *IEC 17025.* General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, 2005.
203. Norme, I., *3534-2: Vocabulaire et symboles Partie 2: Statistique appliquée.* ISO, Genève, 2006.
204. VIM, I., *ISO/TC 213 N 658*, in *International Organization*2004. p. 09-14.
205. Chéneau, E., et al., *Liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometric method for quantification of monensin in plasma and edible tissues of chicken used in pharmacokinetic studies: Applying a total error approach.* Journal of Chromatography B, 2007. **850**(1–2): p. 15-23.
206. Leblanc-Maridor, M., et al., *Quantification of Campylobacter spp. in pig feces by direct real-time PCR with an internal control of extraction and amplification.* Journal of Microbiological Methods, 2011. **85**(1): p. 53-61.
207. Furet, J.-P., et al., *Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR.* FEMS Microbiology Ecology, 2009. **68**(3): p. 351-362.
208. Wang, I.K., et al., *Real-time PCR analysis of the intestinal microbiotas in peritoneal dialysis patients.* Applied and Environmental Microbiology, 2012. **78**(4): p. 1107-1112.
209. Zoetendal, E.G., A.D. Akkermans, and W.M. De Vos, *Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria.* Applied and Environmental Microbiology, 1998. **64**(10): p. 3854-3859.
210. Vanhoutte, T., et al., *Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers.* FEMS Microbiology Ecology, 2004. **48**(3): p. 437-446.
211. Seksik, P., et al., *Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon.* Gut, 2003. **52**(2): p. 237-242.
212. Wu, G.D., et al., *Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes.* Science, 2011. **334**(6052): p. 105-108.
213. Gibson, G.R., et al., *Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin.* Gastroenterology, 1995. **108**(4): p. 975-982.
214. Dethlefsen, L., et al., *The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing.* PLoS Biol, 2008. **6**(11): p. e280.
215. Clemente, J.C., et al., *The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view.* Cell, 2012. **148**(6): p. 1258-1270.
216. Round, J.L., et al., *The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota.* Science, 2011. **332**(6032): p. 974-977.
217. Arnold, I.C., et al., *Helicobacter pylori infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells.* The Journal of clinical investigation, 2011. **121**(8): p. 3088.
218. Elinav, E., et al., *NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis.* Cell, 2011. **145**(5): p. 745-757.
219. Lathrop, S.K., et al., *Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota.* Nature, 2011. **478**(7368): p. 250-254.

220. Robinson, C.J., B.J.M. Bohannan, and V.B. Young, *From Structure to Function: the Ecology of Host-Associated Microbial Communities.* Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2010. **74**(3): p. 453-476.
221. Ley, R.E., et al. *Obesity alters gut microbial ecology*. in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005.
222. Pflughoeft, K.J. and J. Versalovic, *Human microbiome in health and disease.* Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2012. **7**: p. 99-122.
223. Turnbaugh, P.J., et al., *The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice.* Science translational medicine, 2009. **1**(6): p. 6ra14.
224. Armougom, F., et al., *Monitoring Bacterial Community of Human Gut Microbiota Reveals an Increase in Lactobacillus in Obese Patients and Methanogens in Anorexic Patients.* PLoS ONE, 2009. **4**(9): p. e7125.
225. Dicksved, J., et al., *Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease.* ISME Journal, 2008. **2**(7): p. 716-727.
226. Spor, A., O. Koren, and R. Ley, *Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome.* Nature Reviews Microbiology, 2011. **9**(4): p. 279-290.
227. Perry, S., et al., *Gastroenteritis and transmission of Helicobacter pylori infection in households.* Emerging Infectious Diseases, 2006. **12**(11): p. 1701.
228. Brown, L.M., *Helicobacter pylori: epidemiology and routes of transmission.* Epidemiologic Reviews, 2000. **22**(2): p. 283.
229. Jernberg, C., et al., *Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota.* Microbiology, 2010. **156**(11): p. 3216-3223.
230. Zwielehner, J., et al., *Changes in Human Fecal Microbiota Due to Chemotherapy Analyzed by TaqMan-PCR, 454 Sequencing and PCR-DGGE Fingerprinting.* PLoS ONE, 2011. **6**(12): p. e28654.
231. Bailey, M.T. and C.L. Coe, *Maternal separation disrupts the integrity of the intestinal microflora in infant rhesus monkeys.* Developmental psychobiology, 1999. **35**(2): p. 146-155.
232. Holdeman, L., I. Good, and W. Moore, *Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress.* Applied and Environmental Microbiology, 1976. **31**(3): p. 359-375.
233. Freestone, P.P., et al., *Stimulation of bacterial growth by heat-stable, norepinephrine-induced autoinducers.* FEMS Microbiology Letters, 1999. **172**(1): p. 53-60.
234. Turnbaugh, P.J., et al., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest.* Nature, 2006. **444**(7122): p. 1027-131.
235. Blaser, M.J. and S. Falkow, *What are the consequences of the disappearing human microbiota?* Nature Reviews Microbiology, 2009. **7**(12): p. 887-894.
236. Qin, J., et al., *A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes.* Nature, 2012. **490**(7418): p. 55-60.
237. Kerckhoffs, A.P., et al., *Molecular analysis of faecal and duodenal samples reveals significantly higher prevalence and numbers of Pseudomonas aeruginosa in irritable bowel syndrome.* Journal of Medical Microbiology, 2011. **60**(2): p. 236-245.
238. Zhu, Y., et al., *Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis.* Cancer letters, 2011. **309**(2): p. 119-127.
239. Asquith, M. and F. Powrie, *An innately dangerous balancing act: intestinal homeostasis, inflammation, and colitis-associated cancer.* The Journal of experimental medicine, 2010. **207**(8): p. 1573-1577.
240. MacDonald, T.T. and G. Monteleone, *Immunity, inflammation, and allergy in the gut.* Science, 2005. **307**(5717): p. 1920-1925.
241. Ley, R.E., *Obesity and the human microbiome.* Current opinion in gastroenterology, 2010. **26**(1): p. 5-11.

242. Sartor, R.B., *Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis.* Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology, 2006. **3**(7): p. 390-407.
243. Seksik, P., et al., *Review article: the role of bacteria in onset and perpetuation of inflammatory bowel disease.* Alimentary pharmacology and therapeutics, 2006. **24**(s3): p. 11-18.
244. Manichanh, C., et al., *Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach.* Gut, 2006. **55**(2): p. 205-211.
245. Sokol, H., et al., *Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease.* Inflammatory Bowel Diseases, 2006. **12**(2): p. 106-111.
246. Martinez-Medina, M., et al., *Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis.* Inflammatory Bowel Diseases, 2006. **12**(12): p. 1136-1145.
247. Sokol, H., et al. *Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients*. in *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008.
248. Mazmanian, S.K., J.L. Round, and D.L. Kasper, *A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease.* Nature, 2008. **453**(7195): p. 620-625.
249. EPA., U.S., *Approaches for the Application of Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Models and Supporting Data in Risk Assessment (Final Report)*, 2006, U.S. Environmental Protection Agency: Washington, D.C.
250. Jones, H.M., I.B. Gardner, and K.J. Watson, *Modelling and PBPK simulation in drug discovery.* The AAPS Journal, 2009. **11**(1): p. 155-166.
251. Lu, C., C.M. Holbrook, and L.M. Andres, *The implications of using a physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for pesticide risk assessment.* Environmental Health Perspectives, 2010. **118**(1): p. 125.
252. Miquel, S., et al., *Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health.* Current Opinion in Microbiology, 2013. **16**(3): p. 255-261.
253. Ahn, Y., et al., *In vitro enrofloxacin binding in human fecal slurries.* Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2012. **62**(1): p. 74-84.
254. Yatsunenko, T., et al., *Human gut microbiome viewed across age and geography.* Nature, 2012. **486**(7402): p. 222-227.
255. Berthiller, F., et al., *Hydrolytic fate of deoxynivalenol-3-glucoside during digestion.* Toxicology Letters, 2011. **206**(3): p. 264-267.
256. Nagl, V., et al., *Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in rats.* Toxicology Letters, 2012. **213**(3): p. 367-373.
257. Berthiller, F., et al., *Masked mycotoxins: A review.* Molecular Nutrition and Food Research, 2013: p. 165-186.
258. Gilbert, J., et al., *Relative aggressiveness and production of 3-or 15-acetyl deoxynivalenol and deoxynivalenol by Fusarium graminearum in spring wheat.* Canadian Journal of Plant Pathology, 2010. **32**(2): p. 146-152.
259. Poppenberger, B., et al., *Detoxification of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from Arabidopsis thaliana.* Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(48): p. 47905-47914.
260. Yoshinari, T., et al., *Development of a purification method for simultaneous determination of deoxynivalenol and its acetylated and glycosylated derivatives in corn grits and corn flour by liquid chromatography tandem mass spectrometry.* Journal of Food Protection®, 2012. **75**(7): p. 1355-1358.
261. Berthiller, F., et al., *Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **395**(5): p. 1243-1252.

Annexe 1

Rapport sur la démarche qualité appliquée aux travaux réalisés dans le cadre de la thèse universitaire **DON-FIH - Impact des mycotoxines sur le microbiote intestinal humain : cas particulier du déoxynivalénol**

Doctorant : Manuel Saint-Cyr
Direction de thèse : Michel Laurentie
Chef de projet : Agnès Perrin-Guyomard

Responsable Qualité : Mickaël Perrin
Responsable Qualité Adjointe : Nathalie Cadieu

Début de thèse : Janvier 2010

Unité d'accueil : UPP et AB2R (à partir de 01/07/2012, suite réorganisation du laboratoire)
Ecole doctorale : VAS – Vie Agro Santé, Rennes

Préambule

Le présent rapport est établi conformément à la Charte des Thèses de l'Anses,

Les travaux de thèse doivent s'intégrer dans le système de management de la qualité en recherche en place au sein de l'entité. Le management de la qualité en recherche permet de garantir la bonne conduite de la recherche et ainsi de donner confiance dans les résultats de la recherche.

A ce titre, le doctorant accepte d'effectuer ses expériences et manipulations conformément aux méthodes contenues dans le manuel de la qualité du laboratoire dont il a pris connaissance. Le doctorant accepte qu'un audit qualité ait lieu au cours de son travail ainsi qu'il y ait éventuellement un audit qualité à la fin de son travail, préliminaire à la rédaction du bilan qualité de la thèse par le responsable qualité de l'entité et qui devra accompagner son mémoire de thèse. D'autre part, le doctorant accepte qu'une fois par an ait lieu un bilan qualité de son travail dont les conclusions pourront comporter des suggestions d'amélioration.

L'entité d'accueil du doctorant s'engage à prendre en charge et assurer la formation qualité de l'étudiant et à mettre à sa disposition toute la documentation qualité dont il a besoin.

1. Système de management de la qualité du Laboratoire Anses de Fougères

Construit et reconnu depuis 1994, le système qualité du Laboratoire de Fougères a pour objectif de démontrer la compétence du laboratoire pour ces activités d'analyses et d'organisation d'essai d'aptitude. Pour cela, il est accrédité par le COFRAC selon les référentiels :

- NF EN ISO CEI 17025[1] pour ses activités analytiques sur l'identification et/ou la quantification de résidus de médicaments vétérinaires par voie microbiologique et/ou chimique

- NF EN ISO CEI 17043[2] pour ses activités d'organisation d'essais d'aptitude dans le domaine des résidus de médicaments vétérinaires.

Dans la perspective de fiabiliser les données générées et exploitées dans le cadre de travaux de recherche (donc hors périmètre d'accréditation), le laboratoire a élargi, en 2009, le champ d'application de son système de management de la qualité à la recherche. Il s'est basé sur un référentiel interne Anses relatif au management des activités de recherche et de développement expérimental, adapté de la norme ANSI/ASQ/Z1.13-1999[3].

Le système de management de la qualité du laboratoire s'appuie sur un manuel qualité reprenant des dispositions générales d'ordre organisationnel et technique ainsi qu'une procédure de gestion de projet. D'application générale, les prescriptions décrites dans ces documents sont complétées par des plans qualité et procédures spécifiques à certaines activités du laboratoire telles que recherche, développement-validation de méthodes, organisation d'essai d'aptitude, expérimentation animale….

2. Système de management de la qualité du laboratoire appliqué aux travaux de la thèse

Par l'organisation décrite précédemment, les dispositions relatives au personnel (formation, qualification…), aux installations, aux équipements (maintenance, métrologie…), aux approvisionnements, aux méthodes, à la gestion des données ainsi qu'au management de la qualité (documentation, audits internes, travaux non conformes…) viennent en appui aux travaux réalisés dans le cadre de la thèse « **DON-FIH** - Impact des mycotoxines sur le microbiote intestinal humain : cas particulier du déoxynivalénol », conduite par Manuel Saint Cyr (doctorant).

[1] NF EN ISO/CEI 17025 – Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.

[2] NF EN ISO/CEI 17043 – Evaluation de la conformité – Exigences générales concernant les essais d'aptitude

[3] **A**NSI/ASQ Z1.13-1999 - Quality Guidelines for Research.

2.1. Personnel (doctorant, personnel scientifique et technique…)

2.1.1. Le doctorant

Dans le cadre de son processus d'intégration au laboratoire, le doctorant a suivi dès son arrivée une formation sur le système de management de la qualité du laboratoire avec une présentation des différents outils informatiques (Intranet, GED…) et documents (manuel qualité, procédure gestion de projet…) nécessaires à ses activités.

D'un point de vue technique, conformément aux dispositions en place au laboratoire, il a été autorisé à manipuler en bactériologie, en biologie moléculaire et en expérimentation animale et à utiliser les différents appareillages du laboratoire après que son tuteur se soit assuré de ses connaissances et de son savoir-faire. Certaines autorisations ont été adossées à des actions de formations internes ou externes.

Il a bénéficié dans le cadre de sa thèse d'actions de formation externes en lien avec ses travaux. Le récapitulatif est joint au rapport. Il peut être souligné sa participation en 2012 et 2013 à QuaRES, Association pour la qualité en recherche et en enseignement supérieur. Sur la session 2013, le doctorant a d'ailleurs présenté un poster sur la conduite d'un projet de recherche sous assurance qualité.

Au delà de ses travaux, le doctorant s'est impliqué dans la vie du système de management de la qualité en se portant volontaire pour être auditeur interne. Après une formation à la conduite d'audit interne et un juniorat (audit du processus Informatique), il a réalisé 3 audits internes sur différents processus du laboratoire :

- activités du service de soutien technique (préparation de milieux, stérilisation-décontamination, lavage de la verrerie, approvisionnements…)
- personnel (recrutement, formation, habilitation-qualification…)
- développement et validation de méthodes

2.1.2. Personnel du laboratoire impliqué dans les travaux de la thèse

Les personnels scientifiques et techniques associés aux travaux de la thèse appliquent le système de management de la qualité du laboratoire. Certains ont d'ailleurs des responsabilités sur des activités couvertes par l'accréditation.

2.2. Equipements

Tous les équipements analytiques (et éventuels logiciels associés) du laboratoire sont gérés de façon à les maintenir en bon état de fonctionnement et en conformité par rapport aux spécifications métrologiques, lorsque cela est adapté. Un planning annuel organise les différentes opérations (réalisées en interne ou par prestataire) de maintenance et métrologie.

Les équipements utilisés dans le cadre des travaux de la thèse ont bénéficié de cette organisation.

2.3. Gestion du projet

Les travaux de la thèse ont été gérés en mode projet.

La phase de conception du projet a été réalisée préalablement au recrutement du doctorant. Les modalités de présentation et soumission du projet ont suivies les dispositions de l'Agence (lettre d'intention) en réponse à un appel d'offres de thèses universitaires.

La réalisation du projet est préalablement documentée dans des plans de management dits plans de recherche. La description du contenu du projet DON FIH s'est matérialisé par un plan de recherche général précisant le contexte scientifique, les objectifs du projet, les acteurs, le découpage du projet, le planning, un descriptif expérimental, le traitement des données, une analyse des risques, la valorisation des travaux… Ce plan général a été complété, au fur et à mesure de l'avancement du projet, par des plans de recherche spécifiques à chaque phase du projet. Les descriptifs des différentes phases expérimentales sont détaillés : matériel, animaux, méthodes, réactifs, références au système documentaire du laboratoire…

Les différents plans de recherche ont fait l'objet d'une approbation par le directeur de thèse autorisant le démarrage des travaux. Les plans sont portés à la connaissance des membres de l'équipe projet mobilisé sur chaque phase.

Pendant les phases expérimentales, tout écart au plan de recherche a été correctement tracé par des dérogations.

Chaque phase du projet a fait l'objet d'une clôture permettant de faire un bilan de la phase du projet, de dégager les points forts et axes d'amélioration. En particulier, les éventuelles réorientations ou adaptations pour les phases suivantes sont discutées et validées à cette occasion.

Le projet global a également été suivi par l'école doctorale *via* un comité de thèse. Ce comité est composé d'un groupe d'experts et du tuteur à qui le doctorant a présenté périodiquement (2 fois sur les 3 ans) son travail (thématique, travaux réalisés, résultats, interprétations, perspectives) et duquel il a recueilli encouragements, critiques et suggestions. Chaque réunion a fait l'objet d'un compte-rendu rédigé par le doctorant et validé par le comité. Ce compte-rendu a été envoyé au Directeur de VAS et au Président de la commission pédagogie par le tuteur et conservé par le laboratoire (cf. traçabilité §2.4). Le comité a veillé également à l'émergence d'une maturité dans la conduite du projet de thèse et d'un projet professionnel post-thèse raisonné.

2.4. Traçabilité

Du fait de la gestion en mode projet, les travaux de la thèse sont identifiés par le code projet 10BO. Ce code unique est apposé en élément de traçabilité sur tous les documents (papier, numérique) et échantillons en lien avec la thèse.

Elle a été assurée sur différents supports :

- répertoire informatique (Y/ LERMVD/PROJET/UPP10/10BO) : sous la responsabilité du chef de projet et du doctorant, ce répertoire informatique est conçu pour stocker tous fichiers créés et données générées en lien avec le projet. Il fait l'objet d'une administration des droits limitant la modification du contenu aux seuls membres de l'équipe projet.

- cahiers de laboratoire : principalement utilisés pour les phases d'expérimentations, ces cahiers de laboratoire sont mis à disposition pour y consigner les dates, les détails des expériences réalisés, les conditions opératoires, les données brutes … Dans le cadre de la thèse 10BO, 3 cahiers de laboratoires ont été consacrés aux différentes phases expérimentales du projet. Les audits internes (cf 2.7.3) réalisés sur certaines phases expérimentales du projet n'ont pas montré de défaut de traçabilité.

Les échantillons générés/analysés au cours du projet sont identifiés par un code unique, généré par l'application informatique (type LIMS) de traitement des échantillons du laboratoire, Sapphire©. Ce système permet d'assurer l'unicité des codes et facilite l'édition d'étiquette.

2.5. Gestion des données

La sauvegarde des données informatisées est gérée par le service informatique du laboratoire. Elle concerne toutes les données générées par les agents du laboratoire ou logiciels associés à des équipements scientifiques connectés au réseau informatique.

Des protections sont activées sur les fichiers informatiques de façon à limiter l'altération des données. Contrairement aux dispositions du laboratoire, la vérification des données saisies en vue de leur exploitation n'a pas été réalisée de façon systématique. Néanmoins, une attention particulière a été portée sur les données conduisant à des publications.

Les enregistrements techniques et données sur support papier sont conservés par les membres de l'équipe projet pendant la durée du projet et sont ensuite archivés selon les modalités de l'Agence.

2.6. Documentation Qualité

Le doctorant a apporté sa contribution au système documentaire du laboratoire en étant à l'origine de nouveaux documents ou en étant contributeur sur des documents en lien avec ses activités.

2.7. Suivi qualité

Toutes les actions ci-dessous, en lien avec les travaux de la thèse, ont fait l'objet d'un enregistrement et de suivi dans le plan d'action qualité du laboratoire au même titre que toutes les autres actions.

2.7.1. Travaux non-conformes - dérogation

11/D/07/UPP	Dérogation plan de recherche 10.BO1b
11/D/16/UPP	Le projet 10.BO1a ne peut être clôturé pour l'instant car 1 mise au point sur 4 est effective (DON/plasma porc). A la réunion bilan du 28/04/2011, il a été décidé de démarrer la phase 10.BO1c (validation de méthodes) sans attendre la clôture de 10.BO1a comme il était indiqué dans le plan au § 7.
11/D/40/UPP	modifications des échéances de prélèvements ainsi que la méthode de prélèvements des échantillons sanguins suite à l'administration du DON par gavage réattribution des rats à des échéances différentes de celles définies dans le tableau « nombre alea cinétique 10BOe » pour les administrations du DON en IV et par gavage.
11/D/53/UPP	10BO- contrôle de l'axénie des rats avec une autre souche anaérobie que celle précisée dans la procédure
12/D/14/UPP	Projet 10_BO2c. Il n'y aura pas de dénombrements bactériens par étalement sur boites comme indiquer dans le paragraphe 2.2.6 Dosage des échantillons
12/D/47/AB2R	Projet 10BO - Stockage des échantillons. les lieux de stockage des échantillons indiqués dans les différents plans de recherche des sous phases du projet 10BO ne seront pas toujours respectés.

Elles ont toutes pour objet de préciser un écart aux dispositions décrites dans les plans de management.

2.7.2. Travaux non-conformes – non-conformité

11/NC/37/UPP	Utilisation du milieu Luria-Bertani à la place du milieu B pour tester la stérilité des isolateurs

2.7.3. Audits internes

Audit	Champ de l'audit	Conclusion	Nb Ecart
11/AUD/21/UPP	10BO1d – Etude pharmacocinétique du DON chez le porc – phase 1	Traçabilité OK Dispositions relatives à l'expérimentation animale à préciser dans le plan de management Attention particulière sur le remplissage des formulaires d'enregistrement	4
12/AUD/18/UPP	10BO2c – Etude de l'impact du DON sur le microbiote intestinal de rats à flore humanisée	Traçabilité OK Quelques oublis dans le remplissage des formulaires d'enregistrement	0

3. CONCLUSION

L'équipe de management de la qualité du Laboratoire de Fougères atteste que les travaux de thèse réalisés par Manuel Saint-Cyr se sont déroulés en appliquant les dispositions et recommandations du système qualité général du laboratoire, complétées par des procédures spécifiques en lien avec les domaines techniques mobilisés pour la réalisation de la thèse. Ceci permet d'avoir confiance dans la conduite du projet de thèse et dans la qualité des données obtenues.

Fait à Fougères le 30 octobre 2013

Mickael PERRIN
Responsable Qualité Métrologie
Anses - Laboratoire de Fougères

anses

FICHE N°1

Fiche individuelle de formation - Liste des formations reçues

Entité: Anses – Laboratoire de Fougères Unité / service : AB2R

Nom Prénom : SAINT-CYR Manuel

Fonction : Doctorant

Année	Intitulé de la formation	Prestataires	Durée en jours absence**	Diplôme ou qualification obtenue
2011	Encadrement d'équipe, communication et conduite de projet	Frédérique DELOFFRE-VYE, Société Croissens Consulting	3	
2011	Management de projet	Roseline LE SQUERE, ADEFOPE-UBS	1	
2011	Utilisation de MindManager	Pascal SANDERS Michel LAURENTIE, Anses Laboratoire de Fougères	2	
2011	NF EN ISO/CEI 17025 – Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais	Nathalie CADIEU, Anses Laboratoire de Fougères	1	
2011	Auditeurs internes	Pascal BEZIER, Institut de Formation et d'Apprentissage CCIT Saint-malo Fougères	2	
2011	La PCR Quantitative	Bariza BLANQUIER, Fc-3Bio	3	
2012	Réaliser des documents destinés à être imprimés	Jacques CARPENTIER, Université Rennes 2	1	
2012	Réalisation de poster	Jacques CARPENTIER, Université Rennes 2	½	
2012	Réaliser la présentation de ses travaux en présentiel	Jacques CARPENTIER, Université Rennes 2	½	
2012	« Expérimentation Animale Appliquée à la Recherche Biomédicale »	Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée, Université de Caen	10	Diplôme Universitaire

** cette absence concerne **que** le temps pris sur le temps de travail rémunéré. 1 jour = 6heures , 1 mois = 25 jours ; 1 année = 225 jours .Pour la préparation de thèse , hors période de rédaction, afficher au moins 20 jours/an

20/07/2010

anses

FICHE N°2

2012	Ecole inter-organismes sur la qualité en recherche et en enseignement supérieur	QuaRES, Association pour la Qualité en Recherche et Enseignement Supérieur	5	
2012	Les nouveaux visuels : la forme au service du fond	Formaced	1	
2013	Compétences Lettre, CV, Comment positionner au mieux son projet professionnel et personnel ?	Olivier GODARD, Eurobooster	3	
2013	Maîtrise de l'information scientifique - Module 3 : Structurer, diffuser, publier	Université Rennes 2	1	
2013	Modules d'Anglais pour la Recherche – Module 2	Université Rennes 2	4	
2013	Élaborer une stratégie de publication scientifique	Patricia VOLLAND-NAIL, Urfist	1	
2013	Utiliser les cartes heuristiques pour l'enseignement et la recherche	Alexandre SERRES, Urfist	1	
2013	Maîtrise de l'information scientifique - Module 2 : Exploiter ses ressources pour la thèse - Session 2	Université Rennes 2	1	
2013	Outils de recherche et de veille sur l'actualité (new, médias sociaux ….)	Marie-laure MALINGRE, Alexandre SERRES, Urfist	1	
2013	Ecole inter-organismes sur la qualité en recherche et en enseignement supérieur	QuaRES, Association pour la Qualité en Recherche et Enseignement Supérieur	3	

** cette absence concerne **que** le temps pris sur le temps de travail rémunéré. 1 jour = 6heures , 1 mois = 25 jours ; 1 année = 225 jours .Pour la préparation de thèse , hors période de rédaction, afficher au moins 20 jours/an

20/07/2010

Annexe 2

Système de Management de la Qualité en Recherche Appliqué aux Travaux de Thèse au Laboratoire de l'Anses Fougères accrédité ISO 17025

Onzième École Inter-Organismes
"Qualité en Recherche et en Enseignement Supérieur"
9-11 Septembre 2013

Manuel Saint-Cyr, Nathalie Cadieu, Agnès Perrin-Guyomard, Michel Laurentie.
Anses, Laboratoire de Fougères, 35302 Fougères, France. manuel.saint-cyr@anses.fr

Contexte

La mission principale de l'Anses est d'assurer la sécurité sanitaire pour l'Homme dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation. L'agence assure également la protection de la santé et du bien-être des animaux ainsi que la protection de la santé des végétaux.
Afin de garantir la fiabilité et la traçabilité des résultats produits, les activités sont menées selon des exigences de management de la qualité. En 1994, cette démarche a permis au laboratoire de Fougères d'obtenir, pour ses missions de référence, l'accréditation selon les normes NF EN ISO 17025 / NF EN ISO 17043.
Cette démarche qualité a été étendue pour les activités en recherche et appliquée notamment à l'ensemble des travaux de thèse, à partir des années 2000.

Objectifs

-**Structurer le projet de thèse** (gestion de projet)
- Maitriser le temps et les risques

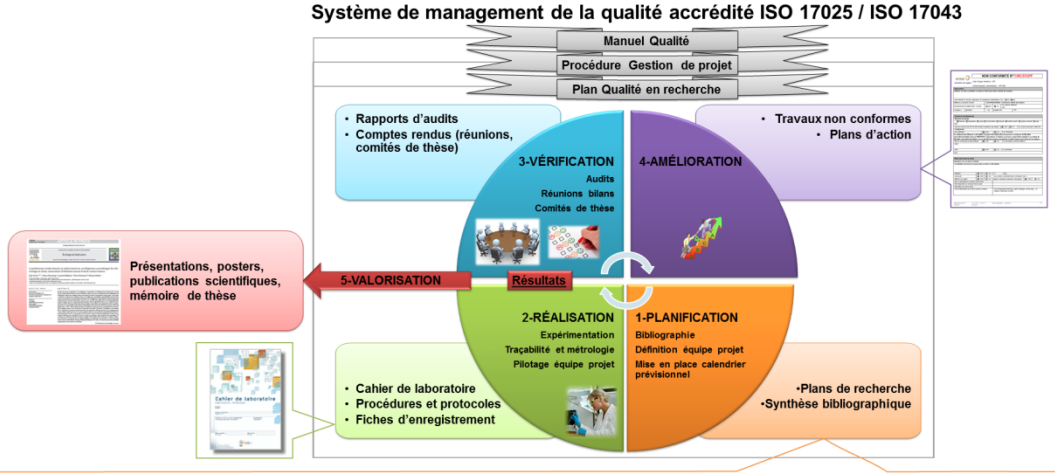
-**Renforcer la traçabilité des travaux** (enregistrement codifié)
- Pérenniser les savoirs et les savoir-faire

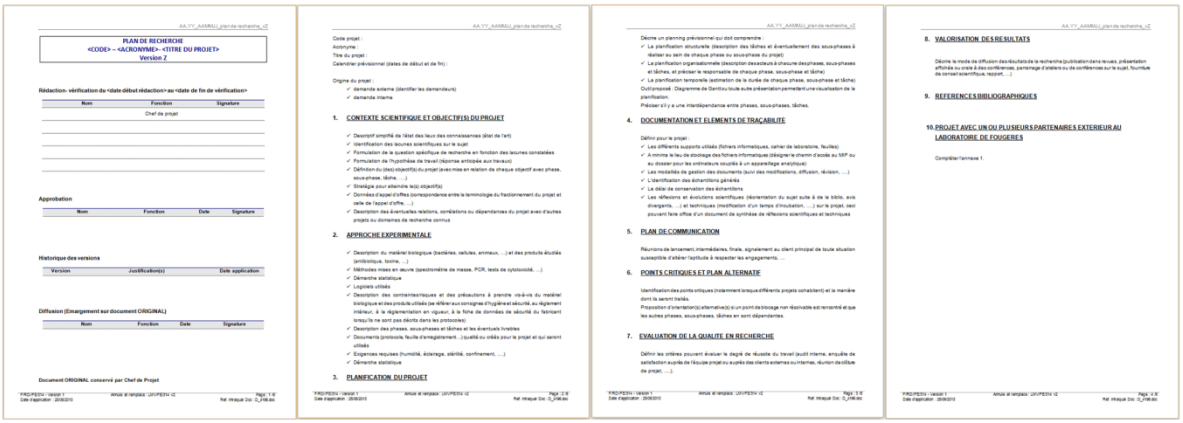
-**Assurer la fiabilité des résultats** (méthodes validées)
- Améliorer la qualité des publications

Améliorer les performances scientifiques, techniques et économiques

Méthodologie

Système de management de la qualité accrédité ISO 17025 / ISO 17043





Outil essentiel de la thèse, le plan de recherche est rédigé, approuvé et diffusé à l'équipe avant de débuter le projet. Il décrit les systèmes de management utilisés pour la planification, la réalisation, la documentation, l'évaluation et le transfert des résultats de recherche.

Conclusion

A travers cette démarche de management de la qualité en recherche, l'Anses améliore les performances scientifiques, techniques et économiques d'un projet de thèse. Elle permet au doctorant de développer ses compétences en qualité, en management d'équipe, en organisation et en communication. Elle améliore les possibilités d'insertion professionnelle dans l'industrie où la notion de qualité est une préoccupation majeure.