



HAL
open science

Interactions entre ribotoxines et génotoxines : mise en évidence des effets "cocktail"

Marion Garofalo

► **To cite this version:**

Marion Garofalo. Interactions entre ribotoxines et génotoxines : mise en évidence des effets "cocktail". Toxicologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. NNT : 2023TOU30023 . tel-04191617

HAL Id: tel-04191617

<https://theses.hal.science/tel-04191617>

Submitted on 30 Aug 2023

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III – Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Marion GAROFALO

Le 8 mars 2023

Interactions entre ribotoxines et génotoxines : mise en évidence des effets « cocktail »

**École doctorale Sciences écologiques, vétérinaires,
agronomiques et bio ingénieries (SEVAB)**

Unités de recherche

INRAE ToxAlim – INSERM IRSD

Directeurs de Thèse

Isabelle Oswald et Jean-Philippe Nougayrède

Jury

Nolwenn Hymery
Inge Huybrechts

Rapporteurs

Armelle Ménard
Marie-Louise Scippo
(présidente)



THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Spécialité : toxicologie alimentaire

Interactions entre ribotoxines et génotoxines : mise en évidence des effets « cocktail »

GAROFALO Marion

Dr. Isabelle Oswald

Dr. Jean-Philippe Nougayrède

Il n'existe qu'une seule manière d'échouer, c'est d'abandonner avant d'avoir réussi.

Remerciements

Le présent travail a été rendu possible par une bourse du ministère français de l'Enseignement supérieur et de la Recherche, et soutenu par une subvention de l'Agence Nationale de la Recherche (GenoFood ANR-19-CE34-0014).

Avant toute chose, j'aimerais préciser que ce travail de thèse m'a permis de tenir dans les moments difficiles. Ma passion pour les sciences et les émotions uniques qui m'ont animées et fait vibrer à chaque seconde de cette thèse m'ont largement aidé à m'accrocher et à surmonter les épreuves de la vie personnelle.

Ce travail n'aurait pas pu être réalisable sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes, à qui je témoigne ma profonde reconnaissance. J'adresse donc un immense merci...

A Marie-Louise Scippo et Armelle Ménard, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, et d'évaluer ce travail.

A Isabelle Oswald. Isabelle, merci pour votre investissement sans faille tout au long de cette thèse, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir appris à mener une démarche scientifique. Au-delà de ça, merci m'avoir donné ma chance en tant que jeune scientifique, de m'avoir permis de faire mes preuves, et de m'avoir fait confiance. Ce fut un grand honneur et une grande chance pour moi d'avoir pu bénéficier de votre encadrement. Merci pour votre exigence qui m'a permis de m'améliorer chaque jour.

A Jean-Philippe Nougayrède. Jean-Phi, merci de m'avoir accompagnée dans mon quotidien à l'IRSD. Merci de m'avoir soutenue, et d'avoir pris autant de temps pour moi. Tout comme Isabelle, j'ai eu énormément de chance de t'avoir comme mentor. Tu m'as appris à être plus rigoureuse, à pousser mes réflexions toujours plus loin, et à me remettre sans cesse en question. Tu m'as également appris à être humble, l'une des qualités que j'admire beaucoup chez toi. J'espère que je n'ai pas été trop horrible comme thésarde, et que tu garderas un bon souvenir de ce co-encadrement avec Isabelle, même si je ne t'ai rapporté que 3€29 par mois ;-).

A Eric Oswald. Eric, même si ça a été difficile au début, je sais maintenant que si vous avez été aussi exigeant avec moi dès les premiers jours de mon stage de M2 dans l'équipe, c'est parce que vous croyiez en moi. Merci de m'avoir poussée au-delà de mes limites, et d'avoir développé ma curiosité scientifique. Tout comme Isabelle et Jean-Phi, j'ai eu énormément de chance de bénéficier de votre encadrement. Maintenant que ma thèse se termine, j'espère que vous trouverez un(e) autre thésard(e) à qui piquer la chaise de bureau...

A Julien Vignard et Imourana Alassane-Kpembi, pour avoir fait partie de mon comité thèse. Merci à tous les deux pour toutes ces riches discussions qui m'ont permis d'avancer pendant toute ma thèse. Julien, une petite mention spéciale pour avoir supporté de me voir débarquer dans ton bureau toutes les 5 minutes pendant les révisions de mon deuxième article. Merci pour ta patience et ton écoute.

A Delphine Payros. Delphine, tu es LA rencontre de ma thèse, mon coup de cœur. Sans toi, rien n'aurait été pareil. Tu es une bouffée de dynamisme et de bienveillance. Dès le début, tu m'as prise sous ton aile. Avec ton expérience, tu m'as aidée à m'adapter à ce co-encadrement, à être à la fois dans une équipe et dans l'autre. Tu m'as fait prendre confiance en moi, et tu m'as appris à m'imposer. Et j'en oublie, je pourrais en écrire des dizaines de lignes... Merci encore pour tout ce que tu as fait pour moi. Nos aventures vont continuer en 2023 et peut-être au-delà, j'ai vraiment hâte de voir ça.

A Priscilla Branchu. Priscilla, je sais que je ne vais pas te manquer, mais j'aimerais malgré tout t'adresser une petite dédicace. J'ai été heureuse de partager mon bureau pendant 4 ans avec une collègue formidable, et auvergnate qui plus est ! Tu m'as écoutée et soutenue dans les moments difficiles, et ça je ne l'oublierai jamais. Merci pour toutes ces longues discussions, pour tous ces fou-rires, et merci pour ta patience. J'ai parfaitement conscience qu'aucun de mes futurs collègues de bureau ne t'arrivera jamais à la cheville. Merci encore.

A Marie Penary. Marie, merci pour l'investissement que tu as mis dans les manips' de mon deuxième article, et merci de m'avoir appris les bases de la culture cellulaire à mon arrivée. Merci d'avoir supporté mes sautes d'humeur et mon stress. J'ai eu de la chance de t'avoir comme technicienne à mes côtés. J'ai hâte de voir la suite !

A Jean-Paul Motta. Jean-Paul, je t'avais promis une mention spéciale, la voici. Même si tu n'étais pas physiquement présent tous les jours, tu m'as toujours soutenue, écoutée et motivée. Tu as toujours gardé un œil bienveillant sur mon parcours, et tu as cru en moi depuis mon arrivée en M2. Je n'oublierai jamais ça.

A Frédéric Taieb. Fred, je n'oublie pas que tu as été l'un des premiers à me faire confiance en me prenant sous ton aile en Master 2. Merci aussi pour toutes les manips' qu'on a partagées, et pour tout ce que tu m'as enseigné pendant ces 4 années.

Aux collègues de l'équipe d'Eric. Frédéric Auvray, Nadège Greif, Matteo Serino, Cécile Goursat, Carine Seguy et Christine Perres. Merci pour tous ces moments de convivialité, merci de m'avoir fait partager vos connaissances, et d'avoir pris du temps pour répondre à mes questions.

Aux collègues de l'équipe d'Isabelle, anciens comme nouveaux. Philippe Pinton, Laura Soler-Vasco, Chrystian Zetina Serrano, Alix Pierron, Ophélie Rocher, Sylvie Puel, Olivier Puel, Joelle Laffitte, Thierry Gauthier et Sophie Lorber. Merci à tous de m'avoir intégrée à l'équipe et de m'avoir donné l'opportunité de profiter de votre expérience.

Aux anciens et nouveaux thésards/stagiaires/post doc de l'IRSD et de ToxAlim que j'ai croisés pendant ma thèse. Camille Chagneau, Min Tang, Alexandre Perrat, Camille Petitfils, Audrey Goman, Asja Garling, Camille Pin, Cécile Guyonnet, Laetitia Le Caous, Benjamin Massiera, Dorian Loubet, Ambre Freyberg, Corentin Brianceau (allias *Coconut*), Nicolas Brouchet, Alexis Bidet, Carine Ayoubi, Nadia Tahtah, Bernadette Willoquet, Yann Malaisé... J'en oublie sûrement, et je m'excuse par avance auprès de ceux que j'oublie. J'ai des souvenirs précieux avec chacun de vous, et je n'oublierais jamais que nous avons partagé des morceaux de nos chemins respectifs.

Il me reste à remercier ma famille et mes amis, sans qui je n'aurais pas accompli le dixième de ce travail. Merci du fond du cœur...

A Maman. J'ai de la chance d'avoir une Maman comme toi. J'ai hérité de ta force de caractère et j'en suis fière. Tu m'as transmis ta rage de vaincre et ta persévérance, et c'est grâce à ces qualités indispensables que j'ai mené à bien ce travail de thèse. Tu as toujours été ma première fan, et un véritable moteur pour moi. Ce travail est aussi le tien. Merci.

A Papa. Je sais que malgré ta maladresse pour exprimer tes sentiments, tu es fier de moi. Je l'ai toujours su, ça se voit dans tes yeux. Papa, je ne te l'ai jamais dit mais plus tard, j'aimerais être comme toi. Merci d'avoir été là en toutes circonstances, même en n'ayant jamais rien compris à mon travail. J'en profite pour remercier Gridou', déjà pour avoir supporté mon père, et bien sûr pour ton écoute et ta bienveillance.

A Mamie P. Mamie, je ne sais pas si tu as vraiment compris ce que j'ai fait pendant ces 4 ans. Je ne peux toujours pas analyser tes prises de sang, mais je suis bel et bien Docteur ! Malgré ça, je sais que tu as toujours été fière de moi, et je suis heureuse de t'avoir rendue fière. Merci pour ton soutien.

A Fraté. Je sais que je ne suis qu'une minable biologiste, et que la biologie n'est pas une vraie science selon toi. N'empêche que tu m'as soutenue quand même à ta manière. Un immense merci. Je t'aime.

Au reste de ma famille qui a aussi été là pour moi, malgré la distance. Je pense notamment à Tata, Tonton et Max'. Un million de mercis pour m'avoir soutenue pendant toute ma scolarité. J'ai de la chance de vous avoir.

A Véronique et Margaux, qui ont été comme une seconde famille pour moi, notamment dans les moments difficiles. Merci mille fois pour tout ce que vous avez fait pour nous.

A Papy et Mamie R. Mamie, comme tu le sais déjà, tu as toujours été comme une deuxième Maman pour moi. Dans ma vie personnelle et professionnelle, tu es le pilier sur lequel j'ai pu m'appuyer dès le jour de ma naissance. Papy, plus qu'un pilier tu es un véritable exemple à suivre. J'ai des grands parents en or, et l'un des plus beaux accomplissements de ma vie est de vous rendre fière. Aucun mot ne pourra jamais être assez fort pour vous remercier pour le rôle que vous jouez dans mon quotidien, et cela va bien au-delà de cette thèse. Merci.

A mes amis de Bourges et d'ailleurs, qui ont toujours été là malgré la distance. Manuel, Joanne, Clotilde, Charlotte, Rémi, Daniela, Antoine... Merci mille fois pour tous les moments passés ensemble avant et pendant cette thèse.

Et enfin, les meilleurs pour la fin... A mes chers voisins de l'Eleven. Céline, Xavier, Babou, Axel, Gwen', Alex et David. Auprès de vous j'ai trouvé plus que des amis, une véritable famille. Un soutien de tous les jours, une bouffée d'oxygène. Bien plus que des simples voisins, vous avez su vous rendre indispensables à ma vie. Merci encore pour m'avoir aidée à surmonter les épreuves de cette thèse et de la vie personnelle. Je vous aime.

Et bien sûr, à Nicolas. Nico, mon amour. Tu es peut-être la personne la plus impactée par ce travail. Cette thèse a rythmé notre vie pendant presque 4 ans. Ta patience sans faille, ton écoute, et tes précieux conseils m'ont été d'une aide indispensable. Tu as tellement entendu parler de cette thèse que tu pourrais toi-même la soutenir ! J'ai le meilleur compagnon de vie que l'on puisse rêver d'avoir. Un immense merci d'avoir traversé cette épreuve avec moi, étape après étape, main dans la main. Cette réussite est la nôtre, encore une de plus... Je t'aime.

Merci à tous... 

Publications et communications

Articles originaux :

Garofalo M, Payros D, Penary M, Oswald E, Nougayrède JP, Oswald I. 2023. A novel toxic effect of foodborne trichothecenes : the exacerbation of genotoxicity. *Environ Pollut.* 18 :317-120625. doi : 10.1016/j.envpol.2022.120625.

Garofalo M, Payros D, Oswald E, Nougayrède JP, Oswald IP. 2022. The foodborne contaminant deoxynivalenol exacerbates DNA damage caused by a broad spectrum of genotoxic agents. *Sci Total Environ.* 10 :820-153280. doi : 10.1016/j.scitotenv.2022.153280.

Reuves :

Garofalo M, Payros D, Oswald E, Nougayrède JP, Oswald IP. 2023. Ribosome : an Achilles' heel for the cell and a target for natural toxins. *Submitted.*

Payros D, **Garofalo M**, Pierron A, Soler-Vasco, Al-Ayoubi C, Maruo V.M, Alassane- Kpembé I, Pinton P, Oswald I.P. 2021. Mycotoxins in human food : a challenge for research. *Cah. Nutr. Diet.* 56 :170–183. doi :10.1016/j.cnd.2021.02.001.

Chapitres de livre :

Terciolo C., **Garofalo M**, Payros D., Willoquet B., Pierron A., Pinton P., Oswald I.P. 2023. Hazard assessment of mycotoxins for farm and companion animals : a European perspective. In : *Mycotoxins : from Field to Feed. Chapitre présenté en annexe III de ce manuscrit.*

Communications (orales et posters) :

Garofalo M. A novel toxic effect of foodborne trichothecenes : the exacerbation of genotoxicity. 2022. Communication orale. 43rd mycotoxins workshop.

Garofalo M. A novel toxic effect of foodborne trichothecenes : the exacerbation of genotoxicity. 2022. Poster. Retraite scientifique de l'IRSD.

Garofalo M. A novel toxic effect of foodborne trichothecenes : the exacerbation of genotoxicity. 2022. Poster. 43rd mycotoxins workshop.

Garofalo M. The foodborne contaminant deoxynivalenol exacerbates DNA damage caused by a broad spectrum of genotoxic agents. 2021. Communication orale. 42nd mycotoxins workshop.

Garofalo M. The foodborne contaminant deoxynivalenol exacerbates DNA damage caused by a broad spectrum of genotoxic agents. 2021. Communication orale. Journée des graines de ToxAlim.

Garofalo M. The foodborne contaminant deoxynivalenol exacerbates DNA damage caused by a broad spectrum of genotoxic agents. 2021. Communication orale. Journée de l'école vétérinaire de Toulouse.

Table des matières

<i>Liste des abréviations</i>	1
<i>Liste des figures</i>	3
INTRODUCTION GENERALE	4
I. Contexte général de l'étude	5
A. Le concept d' « exposome »	5
B. Mycotoxines	6
1. Généralités	6
2. Prévalence des mycotoxines	7
3. Mycotoxines et réglementation.....	8
C. Les ribotoxines	10
1. Généralités	10
2. Les trichothécènes.....	10
<i>i. Généralités</i>	10
<i>ii. Prévalence dans l'alimentation</i>	11
<i>iii. Toxicité</i>	12
<i>iv. Lien structure-fonction</i>	12
D. Génotoxines	13
1. Généralités	13
2. Agents chimiques utilisés en chimiothérapie.....	14
3. Les pesticides	14
4. Génotoxines produites par le microbiote intestinal	15
<i>i. La colibactine</i>	15
<i>ii. La Cytolethal Distending Toxin (CDT)</i>	16
E. Remarques conclusives	18
II. Revues de littérature	19
A. Les mycotoxines en alimentation humaine : un défi pour la recherche	20
B. Le ribosome : un talon d'Achille pour la cellule et une cible pour les toxines naturelles	35

INTRODUCTION AU TRAVAIL EXPERIMENTAL	63
I. Positionnement du sujet.....	64
II. Objectifs de la thèse	65
A. Problématique	65
B. Stratégies utilisées	65
1. Modèles cellulaires et doses d'exposition.....	66
2. Détection des dommages à l'ADN	66
ETUDES EXPERIMENTALES.....	68
Chapitre I.....	69
Le DON exacerbe-t-il la génotoxicité induite par des génotoxines aux modes d'action différents de la colibactine ?.....	69
Chapitre II	83
D'autres trichothécènes reproduisent-ils ce nouvel effet du DON ?	83
Chapitre III	102
Interaction entre génotoxines ribotoxines : application à des toxines bactériennes	102
A. Introduction.....	102
1. La <i>Cytolethal Distending Toxin</i> (CDT)	102
2. La Shiga toxine (Stx)	103
B. Objectif.....	104
C. Matériel et méthodes.....	104
D. Résultats.....	105
E. Discussion.....	110
1. Interaction CDT/DON	110
2. Shiga toxine et chimiothérapie.....	111
<i>i. Infection à EHEC chez les patients sous chimiothérapie</i>	<i>111</i>
<i>ii. Exploiter l'interaction entre Stx et chimio thérapeutiques pour le traitement du cancer.....</i>	<i>112</i>
3. Rôle de l'interaction CDT/Stx dans la virulence bactérienne.....	112
4. Rôle de Stx dans la cancérogénèse induite par CDT	113
F. Conclusion	113

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	114
I. Discussion générale	115
A. Vers l'évolution des critères d'évaluation de la toxicité des contaminants	115
1. Synergies et évaluation du risque	115
2. Classification du DON par le CIRC.....	116
B. Vers une adaptation des régimes alimentaires.....	117
1. Chez les populations les plus exposées aux TCT	117
2. Chez les populations les plus exposées aux génotoxines.....	118
3. Cas particulier des personnes sous chimiothérapie.....	119
II. Perspectives	120
A. Confirmation et validation des résultats obtenus lors de cette étude.....	120
1. Modèles <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i>	120
2. Lignes directrices de l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE).....	121
B. Hypothèses expliquant l'exacerbation de la génotoxicité induite par les ribotoxines	121
1. Inhibition de la réponse aux dommages à l'ADN.....	122
2. Réponse au stress ribotoxique.....	122
3. Inflammation.....	123
4. Stress oxydatif.....	124
5. Dysfonction mitochondriale.....	125
C. Etude des conséquences de l'exacerbation de la génotoxicité.....	126
D. Élargissement à d'autres composés	126
1. Autres ribotoxines	126
2. Autres génotoxines.....	127
<i>i. Agents chimiques et chimiothérapie</i>	<i>127</i>
<i>ii. Génotoxines bactériennes</i>	<i>127</i>
<i>iii. Génotoxines alimentaires.....</i>	<i>128</i>
E. Projets de recherche en cours	131
CONCLUSION	132

REFERENCES	134
ANNEXES	148

Liste des abréviations

- **5-FU** : 5-fluorouracile
- **ADH** : alcool déshydrogénase
- **AEs** : alcaloïdes de l'ergot
- **AFB1** : aflatoxine B1
- **ANC** : anisomycine
- **ATM** : *Ataxia Telangiectasia Mutated*
- **BMDL** : *Benchmark Dose Lower Confidence Level* (dose repère)
- **CDT** : *Cytolethal Distending Toxin* (toxine de distension cytoléthale)
- **CHX** : cycloheximide
- **CIRC** : Centre International de la Recherche sur le Cancer
- **DAS** : diacetoxysisprenol
- **DDT** : dichlorodiphényltrichloroéthane
- **DOM-1** : deepoxy-deoxynivalenol
- **DON** : deoxynivalenol
- **DSB** : *Double Strand Break* (cassures double brin de l'ADN)
- **EFSA** : *European Food Safety Authority* (Autorité Européenne de la Sécurité des Aliments)
- **EHEC** : *Enterohemorrhagic E. coli* (*E. coli* entéro hémorragique)
- **EPT** : époxytrichothéc-9-ène
- **FB1** : fumonisine B1
- **FX** : fusarénone X
- **Gb3** : globotriaosylcéramide
- **HHT** : homoharringtonine
- **LOAEL** : *Lowest Observed Adverse Effect Level* (dose la plus faible avec effet nocif observé)
- **MAPK** : *Mitogen-activated protein kinases*
- **MICI** : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin
- **MoE** : *Margin of Exposure* (marge d'exposition)
- **MOI** : *Multiplicity Of Infection* (multiplicité d'infection)

- **NAC** : N-Acetyl Cystéine
- **NIV** : nivalénol
- **NRF2** : *nuclear factor erythroid-2-related factor 2*
- **NOAEL** : *Non Observed Adverse Effect Level* (dose sans effet nocif observable)
- **OMV** : *Outer Membrane Vesicle* (vésicule de membrane externe)
- **OTA** : ochratoxine A
- **PIB** : Pontage Inter-Brin
- **PK NRPS** : polykétide peptide non ribosomal synthase
- **PKR** : Protéine Kinase R
- **RSR** : *Ribotoxic Stress Response* (réponse au stress ribotoxique)
- **SSB** : *Single Strand Break* (cassure simple brin de l'ADN)
- **Stx** : Shiga toxine
- **SHU** : Syndrome Hémolytique et Urémique
- **SRL** : Sarcin-Ricin Loop
- **T-2** : toxine T-2
- **TCT** : trichothécène
- **TDI** : *Tolerable Daily Intake* (apport journalier tolérable)
- **ZEN** : zéaralénone

Liste des figures

Figures non incluses dans les articles ou les revues

Introduction

p5 : Figure 1 : L'exposome.

p6 : Figure 2 : Maladies fongiques chez les céréales.

p7 : Figure 3 : Intérêt grandissant pour les mycotoxines.

p8 : Figure 4 : Carte des contaminations en mycotoxines.

p11 : Figure 5 : Structure chimique des principaux représentants des 4 groupes de trichothécènes.

p13 : Figure 6 : Poche de liaison du DON et de la toxine T-2 dans la grande sous-unité du ribosome eucaryote. Figure 7 : Les différents types de dommages à l'ADN et leurs voies de réparation.

p16 : Figure 8 : Structure et mode d'action de la colibactine.

p17 : Figure 9 : Production, internalisation et mode d'action de la toxine CDT.

p18 : Figure 10 : Effet de distension cellulaire induit par la toxine CDT.

Introduction au travail expérimental

p64 : Figure 11 : Exacerbation de la génotoxicité de la colibactine par le DON.

p67 : Figure 12 : Principe de l'In-Cell Western. Figure 13 : Schéma simplifié des protéines de la réponse aux dommages à l'ADN.

Etudes expérimentales

p69 : Figure 14 : Différents types de dommages à l'ADN induits par les génotoxines utilisées dans l'étude. Figure 15 : Fixation du DOM-1, du DON, du cycloheximide, et de l'anisomycine au niveau du ribosome eucaryote.

p103 : Figure 16 : Production, internalisation et mode d'action de la toxine Stx.

p106 : Figure 17 : Activité spécifique de la toxine CDT-I.

p107 : Figure 18 : Génotoxicité de CDT-I et son exacerbation par le DON.

p108 : Figure 19 : Activité spécifique de la toxine Stx.

p109 : Figure 20 : Génotoxicité de l'étoposide et son exacerbation par la toxine Stx.

p110 : Figure 21 : Génotoxicité de CDT-I et son exacerbation par la toxine Stx.

Discussion générale et perspectives

p129 : Figure 22 : Génotoxicité du fer héminique.

p130 : Figure 23 : Génotoxicité de l'acétaldéhyde. Figure 24 : Génotoxicité de l'acrylamide.

INTRODUCTION GENERALE

I. Contexte général de l'étude

A. Le concept d' « exposome »

Durant sa vie, l'Homme est exposé à de multiples facteurs environnementaux, qui proviennent de sources variables selon l'âge, le contexte géographique, ou le mode de vie. L'impact de ces expositions sur la santé humaine peut notamment être influencé par la durée d'exposition ou la sensibilité du sujet.

Le concept d'« exposome », introduit par Christopher Wild en 2005, correspond à « la totalité des expositions à des facteurs non génétiques que subit un organisme humain de sa conception à sa fin de vie en passant par le développement « *in utero* » (Wild 2005, 2012). Ces expositions peuvent être classifiées en 3 catégories : l'exposome interne (facteurs de l'hôte, ou endogènes) ; l'exposome externe général, et l'exposome externe spécifique (**figure 1**).

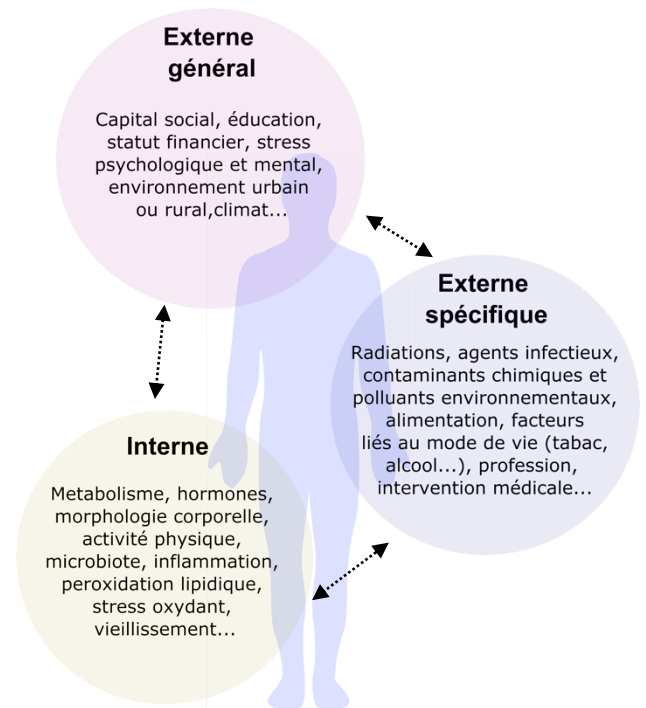


Figure 1 : L'exposome. Le concept d'exposome se décompose en 3 domaines majeurs, illustrés par une liste d'exemples non-exhaustive (Adapté de Wild, 2012).

L'essentiel des études de toxicologie du XX^e siècle s'intéresse aux risques liés aux expositions chimiques individuelles et associe un contaminant à un effet toxique. Or, comme le souligne le concept d'« exposome », ce type de situation est rarissime, voire illusoire, et ne reflète pas la réalité des expositions qui sont multiples et complexes (Barouki 2020). De plus, les facteurs environnementaux qui composent l'exposome sont susceptibles d'interagir entre eux, au travers d'interactions complexes qui ne se résument pas à l'addition de leurs effets pris séparément. Il est donc primordial d'axer la recherche en toxicologie sur l'étude des combinaisons de toxines pour permettre une vision plus intégrée des effets de ces expositions multiples sur notre santé (Dennis *et al.* 2016 ; Escher *et al.* 2017).

Cette thèse s'intéresse aux interactions qui peuvent exister au sein d'un même domaine de l'exposome mais aussi entre domaines. Ces interactions multiples sont étudiées au travers de composantes prépondérantes pour la santé humaine : l'alimentation, le microbiote intestinal, et les infections bactériennes. Plus spécifiquement, ce travail se focalise sur l'étude de l'interaction entre deux types de toxines ubiquitaires au sein de ces grandes composantes, et susceptibles de produire des effets synergiques : les ribotoxines et les génotoxines. Une meilleure compréhension des interactions entre ces deux types de composés permet de mieux appréhender les risques liés à leur présence combinée au sein de l'exposome. La partie introductive de ce manuscrit se décompose donc en deux sous-parties : la première est dédiée aux ribotoxines, et notamment à des toxines fongiques appelées mycotoxines ; et la deuxième est consacrée aux génotoxines.

B. Mycotoxines

1. Généralités

Les champignons microscopiques (ou moisissures) sont des contaminants majeurs de nombreuses denrées alimentaires, et notamment des céréales (Eskola *et al.* 2020). Le développement de champignons microscopiques sur les cultures céréalières peut rendre celles-ci inconsommables et provoquer des maladies des cultures comme la fusariose de l'épi (induite par des champignons du genre *Fusarium*) ou la maladie de l'ergot du seigle (provoquée par des champignons du genre *Claviceps*) (**figure 2**).



Figure 2 : Maladies fongiques chez les céréales. Seigle touché par la maladie de l'ergot du seigle (gauche). Blé touché par la fusariose de l'épi (droite). Source : American Phytopathological Society.

Au-delà des pertes économiques pouvant atteindre plusieurs centaines de milliers de dollars par an (Wu, 2007), la contamination des denrées alimentaires par des moisissures représente un problème de santé publique majeur.

En effet, certains de ces champignons (appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria*) produisent des métabolites spécialisés toxiques appelés « mycotoxines ». Les mycotoxines (du grec « *mykes* », signifiant « champignon » et du latin « *toxicum* », signifiant « poison ») contaminent les denrées alimentaires au champ, pendant le stockage ou durant le processus industriel (pour plus de détails, voir partie « Revues de littérature » de ce manuscrit : **Payros *et al.*, 2021**). Les mycotoxines ont été impliquées dans plusieurs maladies, ou « mycotoxicoses ». Décrite au Moyen Âge, l'ergotisme, ou « feu de saint Antoine » est la première mycotoxicose connue. L'ergotisme était provoqué par les alcaloïdes de l'ergot du seigle, et se manifestait par des hallucinations et des gangrènes (Ghysel and Trotin 2004). La mycotoxicologie moderne a cependant émergé bien plus tard. En effet, la première mycotoxine n'a été mise en évidence que dans les années 1960, à la suite d'une mycotoxicose animale en Angleterre, la « maladie X du dindon » (Richard 2008). Depuis, plusieurs centaines de mycotoxines ont été identifiées. Au fil du temps, l'intérêt de la recherche pour les mycotoxines n'a fait qu'augmenter, que ce soit pour comprendre leur toxicité, leur production, les utiliser en médecine, ou pour trouver des stratégies de détoxification (**figure 3**).

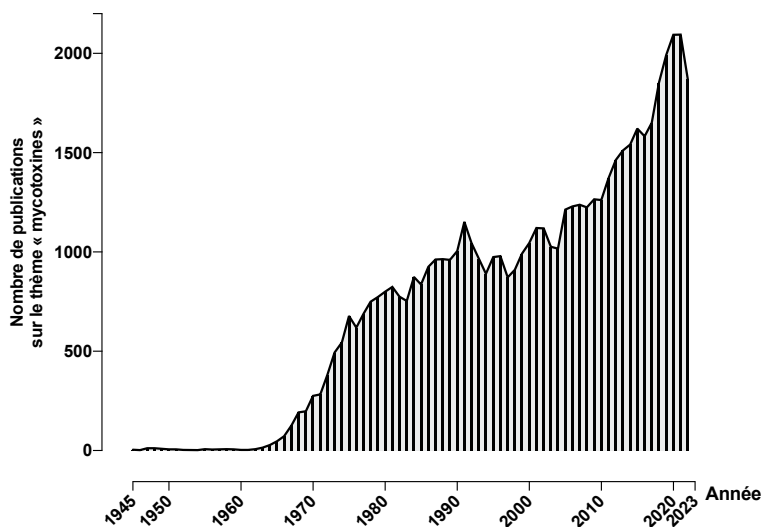


Figure 3 : Intérêt grandissant pour les mycotoxines. Source : données PubMed disponibles au 23/11/2022 pour le mot clef « *mycotoxins* ».

2. Prévalence des mycotoxines

La nature et la prévalence des mycotoxines dépendent de multiples facteurs, qu'ils soient physiques, chimiques, ou biologiques (température, humidité, activité de l'eau, pH, compétitions entre micro-organismes...). Pourtant, contamination fongique ne signifie pas nécessairement contamination par une ou plusieurs mycotoxines, car les conditions favorables à la production de mycotoxines sont spécifiques et indépendantes de celles nécessaires à la croissance du champignon (Doohan *et al.* 2003).

Tous ces facteurs, ajoutés aux différences de quantité de données disponibles selon les pays, participent aux variabilités de prévalence des mycotoxines selon les années et les zones géographiques (**figure 4**). On a longtemps estimé la contamination mondiale globale en mycotoxines à environ 25%. Pourtant, en 2020, une étude a révélé que ce chiffre n'était basé sur aucune étude pertinente publiée. Après analyse détaillée des données de plus de 500 000 analyses des teneurs en mycotoxines dans les aliments, cette étude a conclu que la contamination mondiale en mycotoxines était plus proche des 70% (Eskola *et al.* 2020).

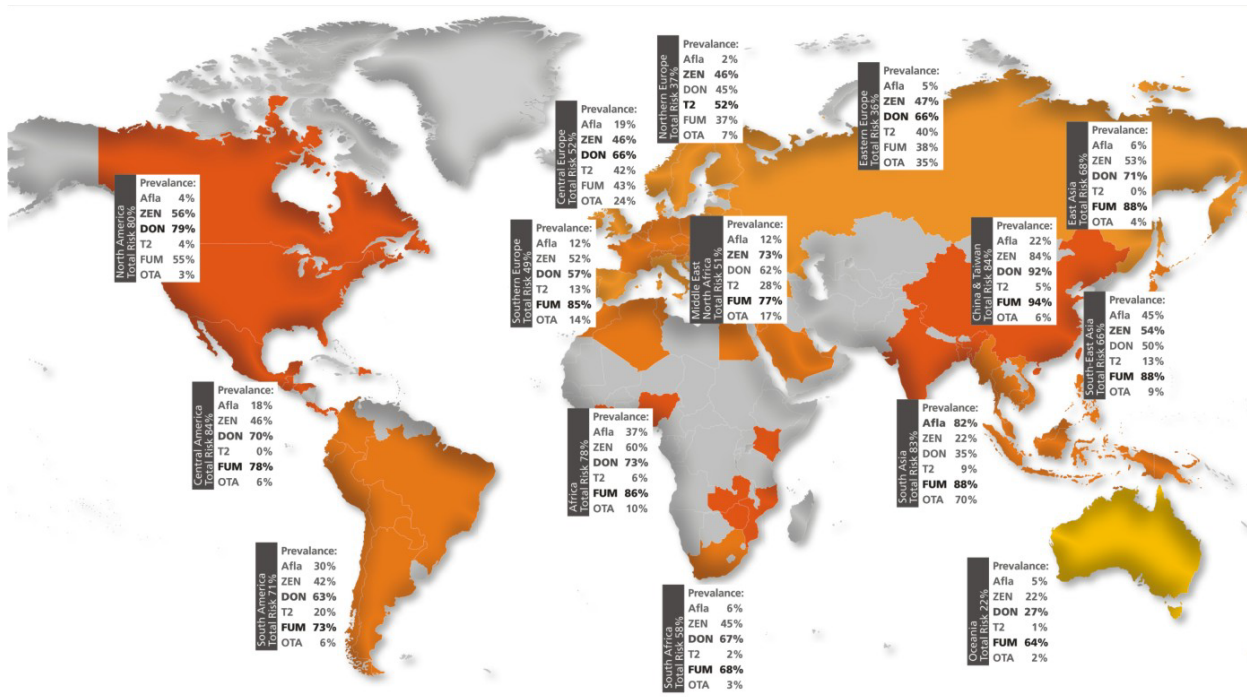


Figure 4 : Carte des contaminations en mycotoxines. Analyse des mycotoxines présentes dans 21 287 échantillons de céréales prélevés entre 2018 et 2019 dans 86 pays. Source : Biomin, 2020.

3. Mycotoxines et réglementation

Au vu de leurs effets toxiques, certaines mycotoxines font l'objet de normes réglementaires dans de nombreux pays. Ces réglementations, visant à protéger les populations, sont très variables selon les différentes régions du monde. En Europe, ces législations reposent sur les expertises fournies par l'Autorité Européenne de Sécurité sanitaire des Aliments (*European Food Safety Authority, EFSA*), qui évalue le risque lié à l'exposition aux toxiques. Pour comprendre le processus d'évaluation du risque par l'EFSA, il faut d'abord noter la différence entre les termes « danger » et « risque ». Le danger représente un élément susceptible de causer des dommages, tandis que le risque représente le degré de probabilité qu'un dommage soit causé (Scheer *et al.* 2014).

L'évaluation du risque se décompose en 3 phases : (1) la caractérisation du danger, (2) l'évaluation de l'exposition, et (3) la caractérisation du risque. La caractérisation du danger consiste en la mise en place de Doses Tolérables Journalières (DJT), ou *Tolerable Daily Intakes* (TDI), grâce à l'étude de courbes dose-réponse pertinentes publiées dans la littérature, obtenues chez des animaux de laboratoires. En particulier, l'objectif de cette étape est de définir des doses critiques à partir d'études dites « pivot ». Ces doses critiques peuvent être déterminées à partir d'une seule valeur de la courbe dose réponse, ou à partir de la totalité des données de la courbe. Dans le premier cas, on s'appuie sur la dose sans effet toxique observable (*Non Observable Adverse Effect Level* (NOAEL)), ou sur la dose la plus faible ayant un effet toxique observable (*Low Observable Adverse Effect Level* (LOAEL)). Dans le second cas, on utilise l'approche de la *Lower Benchmark Dose* (BMDL) (EFSA, 2016). Un facteur de sécurité, visant à extrapoler aux humains les données obtenues chez les animaux, est ensuite multiplié à la NOAEL, LOAEL ou BMDL de référence, pour déterminer la TDI chez l'Homme. Les niveaux d'exposition au danger s'obtiennent en multipliant les données de consommation d'aliments contaminés par les données analytiques sur la concentration du contaminant dans l'aliment, puis en divisant cette valeur par le poids corporel. Enfin, la caractérisation du risque se fait en comparant les données d'expositions aux TDI. Si l'exposition est inférieure à la TDI, il n'y a aucun risque pour le consommateur. Dans le cas contraire, il y a un risque pour le consommateur. Dans le cas particulier des composés cancérigènes, pour lesquels il n'existe pas de dose tolérable, des méthodes d'évaluation du risque alternatives, comme la Marge d'Exposition (*Margin Of Exposure* ; MoE) sont utilisées.

Parmi les mycotoxines faisant l'objet d'une réglementation en France, on compte l'aflatoxine B1, le déoxynivalénol (DON), la fumonisine B1, l'ochratoxine A, la patuline, la zéaralénone et les alcaloïdes de l'ergot. Le mode d'action, la prévalence et la métabolisation de ces mycotoxines réglementées, ainsi que les défis à relever pour l'étude des « nouvelles mycotoxines » et des mélanges de mycotoxines entre elles ou avec d'autres contaminants, sont détaillés dans la première partie « Revues de littérature » de ce manuscrit (**Payros *et al.*, 2021**).

Le DON est la mycotoxine réglementée la plus représentée dans l'alimentation. La suite de cette étude se focalise donc sur le DON, et sur les autres membres de la classe des trichothécènes (TCT) dont il fait partie. Le mode d'action toxique de ces mycotoxines repose sur leur capacité à cibler et inhiber les ribosomes des cellules eucaryotes, faisant d'elles des membres à part entière de la grande famille des ribotoxines.

C. Les ribotoxines

1. Généralités

Le terme « ribotoxine » englobe tous les composés ciblant et inhibant le fonctionnement des ribosomes, eucaryotes ou procaryotes. Les ribotoxines sont souvent produites naturellement par des plantes (ricine, abrine...), des bactéries (cycloheximide, anisomycine...) ou des champignons microscopiques (TCT, α -sarcine...), et ciblent différentes régions des ribosomes, au travers d'un éventail de modes d'actions (Dmitriev *et al.* 2020). Les inhibiteurs du ribosome procaryote, souvent utilisés en tant qu'antibiotiques (aminoglycosides, tétracyclines...), ont été largement décrits dans la littérature. En revanche, les ribotoxines qui ciblent le ribosome eucaryote ont été moins étudiées. Pourtant, un certain nombre d'entre elles peuvent présenter des effets néfastes pour la santé humaine. Par opposition, certaines ribotoxines sont utilisées comme thérapies contre les cancers ou encore contre les maladies génétiques. La revue bibliographique présentée dans la partie « Revues de littérature » de ce manuscrit (**Garofalo *et al.*, soumis**) a mis en lumière l'existence d'effets toxiques partagés entre deux ribotoxines de l'exposome qui présentent des modes d'actions très différents.

2. Les trichothécènes

i. Généralités

Les TCT sont des mycotoxines chimiquement apparentées produites principalement par des champignons appartenant aux espèces *Fusarium*, *Myrothecium* et *Stachybotrys*. Le groupe des TCT comprend plus de 200 molécules non volatiles qui partagent leur structure sesquiterpénoïde avec un noyau tricyclique 12,13-époxytrichothéc-9-ène (EPT) et une double liaison entre les C₉ et C₁₀, mais qui diffèrent par leurs substitutions chimiques. Ainsi, leurs schémas de substitutions permettent de les classer en 4 groupes. Les TCT de type A et B sont les plus prévalents dans l'alimentation, et se différencient par la présence d'un groupe céto-oxygène en C₈ chez les TCT du groupe B, absent chez les TCT du groupe A (**figure 5**) (McCormick *et al.* 2011). Le groupe A est majoritairement représenté par la toxine T-2 et ses dérivés, et par le diacétoxcisprenol (DAS). Le groupe B est représenté par le DON, le nivalénol (NIV), et la fusarénone X (FX). Les TCT de type C (crotocine), produits par des champignons du genre *Trichothecium* qui contaminent certains fruits, sont peu prévalents dans les aliments. Les TCT de type D, dits « macrocycliques » car ils présentent un cycle additionnel en C₄ et C₁₅ du cycle EPT (**figure 5**), sont produits par des champignons du genre *Stachybotrys*, qui contaminent notamment les intérieurs humides (papiers peints) (Foroud *et al.* 2019).

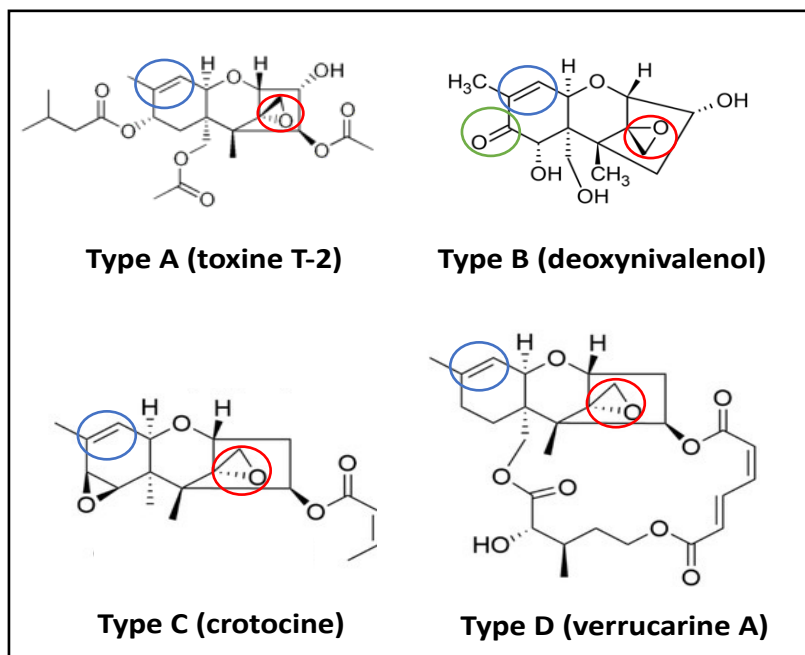


Figure 5 : Structure chimique des principaux représentants des 4 groupes de trichothécènes. Le cycle 12-13 EPT a été encerclé en rouge, la double liaison C₉-C₁₀ en bleu, et le groupe kéto-oxygène distinguant les TCT-B des TCT-A en vert.

ii. Prévalence dans l'alimentation

Les TCT contaminent les cultures céréalières, et notamment le blé, l'orge, l'avoine, le seigle et le maïs. On estime qu'en Europe, près de 50% des céréales sont contaminées par le DON (EFSA, 2017a), 16% par le NIV (EFSA, 2017b) et 10% par la FX (Schothorst and van Egmond 2003). La toxine T-2 a été détectée dans 20% des échantillons de céréales européens (EFSA, 2017c), et le DAS dans 1,5% des céréales et des aliments à base de céréales européens (EFSA, 2018). Comme la plupart des mycotoxines, les TCT sont très stables, résistent aux procédés de transformation, et peuvent être désactivés uniquement par des conditions très alcalines ou très acides. Par exemple, seulement 1.7 à 4.1% du DON contenu dans des échantillons de blé naturellement contaminé est détruit après 30 minutes de cuisson à 200°C (Israel-Roming and Avram 2010). Les TCT se retrouvent donc dans les produits finis à base de céréales. Parmi les denrées alimentaires les plus incriminées dans l'exposition aux TCT, on retrouve donc les farines, le riz, le blé, les pâtes, les pizzas, le pain, les biscuits, les céréales du petit déjeuner, les produits de boulangerie, mais aussi les produits fermentés à base de céréales comme la bière (EFSA 2017a, 2017b, 2017c, 2018). Dans l'alimentation, les TCT se retrouvent très souvent en co-occurrence. En effet, un champignon produit souvent plusieurs TCT à la fois, puisqu'ils sont issus de voies de biosynthèse communes (Eskola *et al.* 2020).

iii. Toxicité

Les TCT sont des molécules de faibles poids moléculaires (250 à 500 Da), qui peuvent donc facilement diffuser au travers des membranes des cellules, et cibler l'intégralité des organes. Dans les cellules intoxiquées, les TCT ciblent les ribosomes, inhibent la synthèse protéique, activent la réponse au stress ribotoxique (RSR), et déclenchent notamment des effets pros inflammatoires et apoptotiques (pour plus de détails, voir partie « Revues de littérature » de ce manuscrit : **Garofalo et al., soumis**). Les effets cellulaires des TCT se répercutent notamment sur le système immunitaire, la croissance, et la physiologie digestive (pour plus de détails, voir partie « Revues de littérature » de ce manuscrit : **Payros et al., 2021**). Malgré de nombreux effets communs à tous les TCT, certains induisent des effets plus spécifiques. Notamment, leurs doses létales peuvent varier d'un facteur 1 000 d'un TCT à l'autre (**Garofalo et al., 2023**). Ces différences de toxicité pourraient s'expliquer par l'existence d'un lien structure-fonction, et notamment par leurs schémas de substitutions, qui diffèrent d'un TCT à l'autre.

iv. Lien structure-fonction

Au niveau cellulaire, tous les TCT inhibent le fonctionnement des ribosomes eucaryotes, en se fixant au site A de la grande-sous-unité ribosomale. Cela provoque une gêne stérique qui bloque la synthèse protéique et active de nombreuses voies de réponses au stress (pour plus de détails, voir partie « Revues de littérature » de ce manuscrit : **Garofalo et al., soumis**). Malgré ce mode d'action « universel », les différences de schémas de substitution influencent leur positionnement dans la poche ribosomale, modulent leur affinité avec le ribosome, et pourraient ainsi expliquer les différences de toxicité entre les TCT (Wu *et al.* 2013). Une étude structurale a proposé de classifier les substitutions chimiques des TCT en deux catégories. Selon la classification de Wang *et al.*, les substitutions de type I (en C₄, C₇, C₈, C₁₅ ou C₁₆) n'ont pas d'impact sur la liaison au ribosome, ou augmentent le nombre de contacts avec le ribosome si elles se retrouvent face à une poche ribosomale étroite. Les substitutions de type II (en C₃, C₁₂, C₁₃) gênent la liaison au ribosome et perturbent les contacts, diminuant l'affinité avec le ribosome comparativement aux substitutions de type I (**figure 6**) (Wang *et al.* 2021). De ce fait, les TCT les plus toxiques sont ceux qui portent des substitutions de type I, comme la toxine T-2 et le DAS.

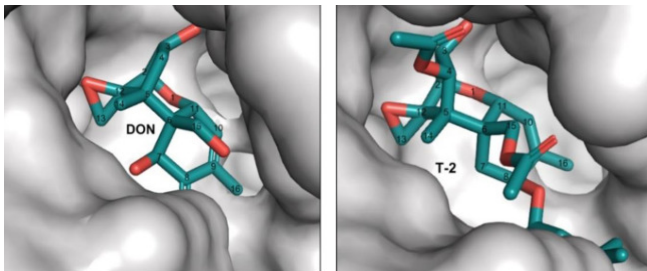


Figure 6 : Poche de liaison du DON et de la toxine T-2 dans la grande sous-unité du ribosome eucaryote. Extrait de Wang *et al.*, 2021.

D. Génotoxines

1. Généralités

Comme vu précédemment, les ribotoxines, et notamment les TCT, sont des membres à part entière de l'exposome. Dans l'exposome, on retrouve également des composés appelés « génotoxines ». Le terme « génotoxines », littéralement « toxique pour le gène » sera utilisé dans ce manuscrit pour désigner des composés qui compromettent l'intégrité du génome, ou plus simplement, qui induisent des dommages à l'ADN. Ces génotoxines sont responsables de divers types de dommages à l'ADN (cassures simple brins ou double brin, pontages inter brins ou intra brins, modifications de bases, adduits...). Pour prendre en charge et initier la réparation de ces dommages, hautement toxiques et sources de mutations génétiques, les cellules eucaryotes mettent en place la réponse aux dommages à l'ADN (*DNA damage response* ou DDR), qui diffère selon le type de dommage infligé (**figure 7**). Si ces dommages ne peuvent pas être réparés, la cellule enclenche l'apoptose pour limiter la transmission d'un patrimoine génétique défectueux aux cellules filles (Jackson and Bartek 2009).

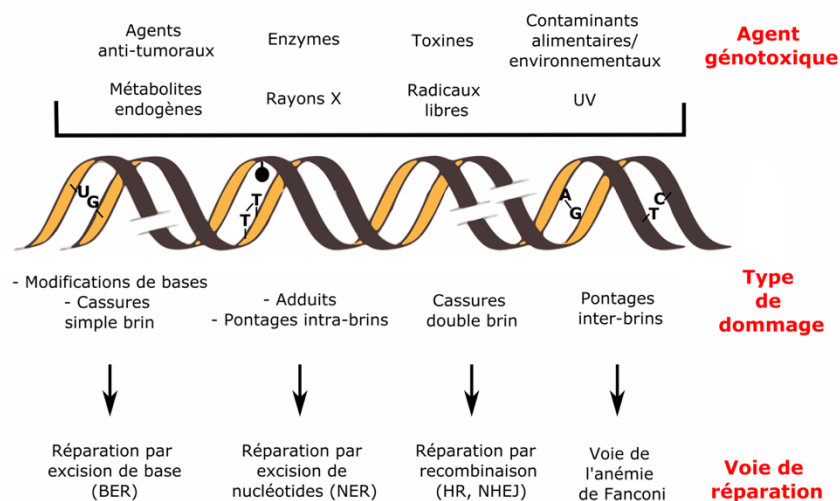


Figure 7 : Les différents types de dommages à l'ADN et leurs voies de réparation (Adapté de Alhmoud *et al.*, 2020).

2. Agents chimiques utilisés en chimiothérapie

Les génotoxines sont couramment utilisées dans le cadre de traitements médicamenteux, et notamment dans le traitement de cancers (Mehta and Haber 2014). En chimiothérapie, on retrouve principalement 3 familles de génotoxines aux modes d'actions bien distincts : les agents alkylants, les bléomycines, et les inhibiteurs de topoisomérases. Les agents alkylants (cisplatine et dérivés) sont des molécules porteuses de groupements alkyle, qui induisent des pontages inter-brins ou intra-brins à l'ADN, en se liant préférentiellement au niveau des bases guanine. Ces liaisons covalentes empêchent l'accès des polymérase à l'ADN par encombrement stérique, et mènent, à terme, à la formation de cassures de l'ADN (Dasari and Tchounwou 2014). Les bléomycines (phléomycine et apparentés), sont des composés radiomimétiques qui induisent des dommages comparables à ceux provoqués par les rayonnements ionisants. Elles endommagent l'ADN par oxydation, en formant des espèces réactives de l'oxygène qui provoquent des cassures simple et double brin de l'ADN (Chen and Stubbe 2005). Les topoisomérases sont de grosses protéines qui assurent la condensation et décondensation des chromosomes pendant la division cellulaire. Les camptothécines (inhibiteurs de topoisomérases de type I), ou l'étoposide (inhibiteurs de topoisomérases de type II) empêchent l'action de ces enzymes, et bloquent ainsi la réplication de l'ADN en provoquant des cassures double brin (Pommier 2006 ; Chan *et al.* 2015).

En chimiothérapie, les génotoxines sont utilisées à fortes doses, et en exposition aigue (ou *bolus*). Ces doses, dites « cytotoxiques » induisent la mort cellulaire, due à l'accumulation de lésions à l'ADN trop nombreuses pour être prises en charge efficacement par la DDR. En revanche, l'exposition chronique à de faibles doses de génotoxines peut favoriser la cancérogénèse en générant des mutations génétiques, notamment dans des gènes pro-apoptotiques. De ce fait, lorsque les génotoxines sont apportées par l'alimentation, ou même par notre propre microbiote intestinal, elles peuvent représenter un risque pour la santé. Parmi les génotoxines auxquelles nous sommes susceptibles d'être chroniquement exposés à de faibles doses, on retrouve certains pesticides.

3. Les pesticides

Dans le monde, on estime qu'environ 385 millions de cas d'empoisonnement aigu aux pesticides se produisent par an, et environ 11 000 sont fatals (Boedker *et al.* 2020). Parmi les pesticides nocifs pour la santé, certains peuvent favoriser le développement de tumeurs.

Par exemple, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé le malathion (insecticide), le glyphosate (herbicide) et le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) (insecticide) comme "probablement cancérigènes pour l'Homme" (groupe 2A), et le lindane (insecticide) comme "cancérigène pour l'Homme" (groupe 1). Malgré le fait que certains d'entre eux aient été interdits il y a plusieurs années, il est important de noter que la plupart des pesticides ont une demi-vie extrêmement longue. Ainsi, on les retrouve dans les sols et donc dans les produits alimentaires très longtemps après leur dernière utilisation. Par exemple, la chlordécone a une demi-vie allant de 250 à 650 ans.

Le potentiel carcinogène des pesticides peut être basé sur divers modes d'action au niveau cellulaire (blocage de la respiration mitochondriale, perturbation de la division cellulaire, perturbation de la production d'acides aminés aromatiques...). Pour certains, leur carcinogénicité repose sur leur génotoxicité. Parmi les pesticides génotoxiques, on peut citer le captane, un fongicide utilisé pour lutter contre le développement fongique notamment sur les fruits (pommes, pêches, cerises, tomates...) en Europe de l'Est et du Sud, qui a été associé à un risque de myélomes chez les agriculteurs. Le manque de données évident sur le mode d'action précis du captane au niveau de l'ADN a mené à sa classification comme « suspecté d'induire le cancer » par la Commission Européenne en 2008. Cependant, une étude suggère que le captane induit des dommages de type oxydatifs qui mènent à la formation de cassures double brin de l'ADN (Fernandez-Vidal *et al.* 2019).

4. Génotoxines produites par le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est un consortium complexe de bactéries vivant dans l'intestin. Composante majeure de l'exposome interne qui joue un rôle primordial dans la physiologie (protection contre les pathogènes, modulation du système immunitaire, digestion...), le microbiote peut également être à l'origine d'effets néfastes pour l'hôte. Notamment, certaines bactéries de l'espèce *Escherichia coli*, qui colonisent l'intestin dès la naissance et sont ubiquitaires dans notre microbiote intestinal, produisent des génotoxines. Chez *E. coli*, les deux génotoxines les plus étudiées sont la colibactine et la toxine de distension cytoléthale (*Cytolethal Distending Toxin* ; CDT).

i. La colibactine

Certaines souches d'*E. coli* sont porteuses de l'îlot génomique *pks*, qui code pour une machinerie de biosynthèse complexe composée d'enzymes de type polykétide peptide non ribosomal synthase (PK NRPS).

Cette machinerie, semblable à une chaîne d'assemblage automobile, est composée de 19 protéines (de ClbA à ClbS) qui synthétisent la génotoxine colibactine (Nougayrède *et al.*, 2006).

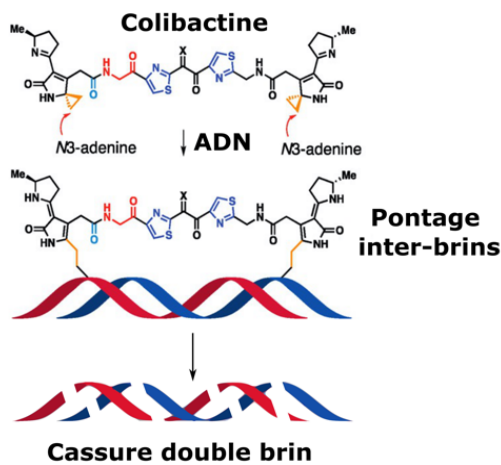


Figure 8 : Structure et mode d'action de la colibactine.

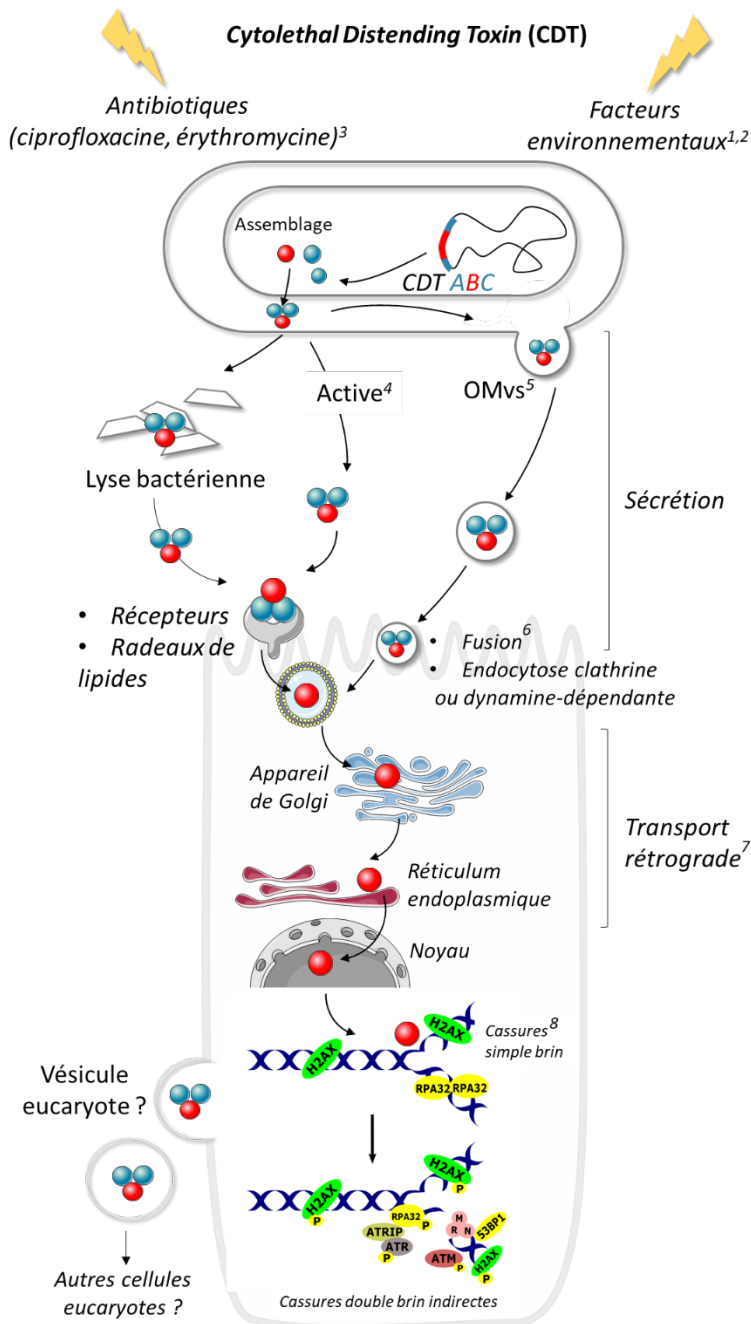
Dans les pays industrialisés, environ 25% des adultes sains sont porteurs de souches arborant l'îlot *pks* (Putze *et al.* 2009). Les enzymes de l'îlot *pks* synthétisent d'abord une prodrogue (pré-colibactine), qui est ensuite clivée et activée par la peptidase clbP dans le périplasme bactérien, avant d'être exportée (pour une revue, voir Chagneau *et al.* 2022). La structure de la colibactine est longtemps rest e un mystère. En effet, l'absence d'effet génotoxique dans un surnageant de culture de bactéries exprimant

l'îlot *pks*, qui suggère que la molécule est instable chimiquement et/ou que son activité nécessite un contact étroit avec la cellule hôte, a compliqué sa purification et les investigations. Sa structure n'a été élucidée qu'après la découverte de son mode d'action précis au niveau de l'ADN. En effet, la colibactine forme des pontages inter-brins (PIBs), qui sont ensuite convertis en cassures double brin (DSBs) (**figure 8**) (Bossuet-Greif *et al.* 2018). Cette propriété a permis l'élucidation de la structure de la colibactine, purifiée très récemment sous sa forme liée à l'ADN (Wilson *et al.* 2019 ; Xue *et al.* 2020). Les dommages à l'ADN induits par la colibactine favorisent l'aneuploïdie et l'instabilité chromosomique, et mènent, à terme, à l'apparition de mutations génétiques (Cuevas-Ramos *et al.* 2010 ; Dziubańska-Kusibab *et al.*, 2020 ; Pleguezuelos-Manzano *et al.*, 2020). De nombreux arguments sont en faveur d'un lien entre colibactine et cancer colorectal. Par exemple, dans un modèle de colite intestinale chez des souris, la colibactine favorise le développement de cancers du côlon (Arthur *et al.*, 2012 ; Dejea *et al.* 2018), et les souches *pks*⁺ sont plus fortement associées avec la muqueuse intestinale chez les patients atteints de cancer colorectal, comparativement à des patients contrôle (Arthur *et al.* 2012).

ii. La Cytotoxic Distending Toxin (CDT)

Les toxines CDT ont été identifiées en 1988 par Johnson et Lior à partir de filtrats de cultures d'*E. coli* isolées de patients atteints de diarrhée (Johnson and Lior 1988).

Ces génotoxines appartenant à la famille des exo/endonucléases sont produites par plus de 30 espèces bactériennes à Gram négatif.



CDT est une toxine tripartite de type A-B₂ (3 sous-unités, dont une active (A), la sous unité CdtB, et deux de liaison (ou « binding », B)   la cellule cible : CdtA et CdtC). La toxine CDT est produite dans le cytoplasme bactérien puis assemblée dans le périplasme, et exportée de manière active, par lyse bactérienne, ou *via* des vésicules de membrane externe bactériennes, ou *Outer Membrane Vesicles* (OMVs) (**figure 9**) (Taieb *et al.* 2016).

Figure 9 : production, internalisation et mode d'action de la toxine CDT. Références : 1 : McBroom *et al.*, 2007 ; 2 : Maredia *et al.*, 2012 ; 3 : Ismael *et al.*, 2005 ; 4 : Ueno *et al.*, 2006 ; 5 : Bielaszewska *et al.*, 2017 ; 6 : Rompikuntal *et al.*, 2012 ; 7 : DiRienzo 2014 ; 8 : Bazine *et al.* 2014.

Les OMVs transportant la toxine sont internalisées dans la cellule cible, par fusion ou endocytose avec la membrane de la cellule eucaryote. Pour la forme libre de la toxine, les sous unités CdtA et CdtC interagissent avec des radeaux lipidiques riches en cholestérol, avec la sphingomyéline synthase 1, ou avec des récepteurs cellulaires glycolipidiques et glycoprotéiques (Eshraghi *et al.* 2010 ; Carette *et al.* 2011) (**figure 9**).

La sous-unité CdtB, qui porte l'activité génotoxique, rejoint ensuite le noyau cellulaire par le système de transport rétrograde. Une fois dans le noyau, la sous-unité CdtB, structurellement homologue à la DNase I, provoque des cassures simple brin de l'ADN dès une heure après son internalisation (Taieb *et al.* 2016). Ces cassures simple brin sont ensuite converties en DSBs (Fedor *et al.* 2013) (**figure 9**). Les atteintes de l'ADN eucaryote induites par CDT engendrent des conséquences telles que l'instabilité génétique, l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et la sénescence. Le phénomène de sénescence, ou « vieillissement cellulaire », a d'ailleurs donné son nom à la toxine CDT. En effet, la sénescence cellulaire, qui se traduit par un arrêt irréversible de la division, s'accompagne d'altérations radicales de phénotype (distension cellulaire) (Gorgoulis *et al.* 2019) (**figure 10**).

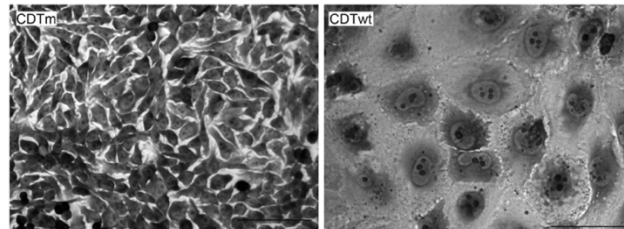


Figure 10 : Effet de distension cellulaire induit par la toxine CDT. Cellules HeLa traitées avec la toxine CDT active (CDTwt) ou sa forme inactive (CDTm), et colorées au bleu de méthylène 72h après traitement. Barres = 100 μ m (extrait de Taieb *et al.*, 2016).

E. Remarques conclusives

A la lumière du concept d'exposome, il est primordial d'orienter petit à petit les recherches en toxicologie vers l'étude des multi expositions. Dans ce contexte, cette étude s'est intéressée à l'interaction entre deux grandes classes de contaminants ubiquitaires dans l'exposome, les ribotoxines et les génotoxines. L'introduction de ce manuscrit souligne qu'il existe une grande diversité de ribotoxines et de génotoxines, qui proviennent de sources variées (alimentation, microbiote, traitements...). Ce chapitre introductif a illustré chacune de ces grandes familles de toxines par des exemples qui seront étudiés en interaction dans la partie expérimentale de cette thèse.

II. Revues de littérature

La partie revue de la littérature de ce manuscrit consiste en deux revues, l'une publiée en 2021 et l'autre récemment soumise pour publication. Ces deux revues couvrent deux axes majeurs de cette thèse : les mycotoxines et les ribotoxines.

La première revue est une revue « grand public », revue par les pairs, et rédigée en français. Elle décrit en termes simples et accessibles au plus grand nombre ce que sont les mycotoxines, leur métabolisation et leurs effets toxiques sur notre santé. Cette revue illustre également l'importance des défis à relever dans le domaine de l'étude des mycotoxines, et les difficultés qui peuvent être rencontrées dans ce domaine de recherche. Il est primordial de transmettre efficacement ce genre de message à un public non spécialiste. En effet, les mycotoxines contaminent l'alimentation de tout un chacun. Aux vues de leurs effets significatifs sur la santé, elles devraient donc être prises en considération dans tous les domaines impliquant la santé humaine.

La deuxième revue est rédigée dans des termes beaucoup plus spécifiques, puisqu'elle vise un public plus averti. Cette revue décrit la complexité des réponses cellulaires mises en place par les cellules eucaryotes en réponse aux ribotoxines. Au travers de l'étude de deux ribotoxines aux modes d'actions bien distincts, cette revue souligne que ces réponses cellulaires sont indépendantes du mode d'action de la ribotoxine.

A. Les mycotoxines en alimentation humaine : un défi pour la recherche

La toxicité de l'aflatoxine B1, du deoxynivalenol, de la fumonisine B1, de l'ochratoxine, de la patuline, de la zéralénone et des alcaloïdes de l'ergot est bien décrite à ce jour. De ce fait, des réglementations ont été mises en place au niveau Européen. En revanche, certaines mycotoxines dites « émergentes », ou « modifiées » sont mal connues. L'étude de ces composés est le premier défi à relever pour la recherche en mycotoxicologie. Comme décrit dans l'introduction, l'étude des mélanges, pour le moins primordiale, n'en est qu'à ses balbutiements, et représente donc le deuxième défi à relever. Cette revue détaille la toxicité des mycotoxines réglementées et leurs modes d'action, et les premières avancées dans l'étude des deux défis à relever.

Cette revue a été publiée dans *Cahiers de Nutrition et Diététique* en février 2021.

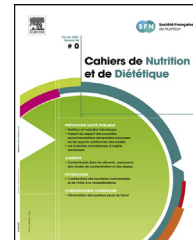


Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



TOXICOLOGIE

Les mycotoxines en alimentation humaine : un défi pour la recherche



Mycotoxins in human food: A challenge for research

Delphine Payros^{a,*}, Marion Garofalo^{a,b}, Alix Pierron^b,
Laura Soler-Vasco^b, Carine Al-Ayoubi^b,
Viviane M. Maruo^{b,c}, Imourana Alassane-Kpembé^d,
Philippe Pinton^b, Isabelle P. Oswald^{b,*}

^a IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRAE, ENVT, UPS, Toulouse, France

^b Toxalim, Research center in Food Toxicology, Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-PURPAN, UPS, Toulouse, France

^c Curso de Medicina Veterinária, Universidad Federal do Tocantins, Caixa Postal 132 - CEP 77.804-970, Araguaína, Tocantins, Brazil

^d Department of Veterinary Biomedicine, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, 3200, rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, J2S 2M2 Québec, Canada

Reçu le 6 janvier 2021 ; accepté le 5 février 2021

Disponible sur Internet le 25 mars 2021

Résumé L'exposition alimentaire humaine aux mycotoxines est une préoccupation croissante pour la sécurité sanitaire des aliments et la santé publique. Très répandues dans nos aliments, ces toxines ont des modes d'action différents et de nombreux effets sur la santé. Des réglementations, basées sur leur occurrence et/ou leur toxicité chez l'Homme et l'animal, ont été établies pour l'aflatoxine B1, le déoxynivalénol, la fumonisine B1, l'ochratoxine, la patuline, la zéaralénone et les alcaloïdes de l'ergot. Outre ces toxines "réglementées", de nouveaux métabolites secondaires, les "formes modifiées" et les mycotoxines "émergentes", représentent un défi pour la recherche. Notre alimentation pouvant être contaminée par de nombreuses substances, l'étude des mélanges de mycotoxines ou de l'association des mycotoxines avec d'autres contaminants alimentaires constitue un autre défi pour la recherche. Cette étude détaille l'occurrence, la métabolisation, le mode d'action et la toxicité des mycotoxines réglementées, ainsi que les premières réponses aux deux défis à relever.

© 2021 Société française de nutrition. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Auteur correspondant.

Adresses e-mail : delphine.payros@inserm.fr (D. Payros), isabelle.oswald@inrae.fr (I.P. Oswald).

Summary Human exposure to mycotoxins through our diet is a growing concern in term of both food safety and public health. These toxins, produced by moulds, are very prevalent in our food. Because of their very different chemical structure and mode of action, mycotoxins induce several health effects. At the European level, regulations based on their occurrence in food and/or their toxicity for humans and animals, have been established for seven mycotoxins: aflatoxin B1, deoxynivalenol, fumonisin B1, ochratoxin, patulin, zearalenone and ergot alkaloids. In addition to these “regulated” toxins, new secondary fungal metabolites, described as “modified forms” and “emerging” mycotoxins represent a challenge in term of research. Since our food can be contaminated by many substances, the study of mycotoxin mixtures or the association of mycotoxins with other food contaminants is another challenge for research. This review details the occurrence, metabolism, mode of action and toxicity of each of the regulated mycotoxins, as well as the first answers to both challenges for the coming years.

© 2021 Société française de nutrition. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction—Qu’est-ce qu’une mycotoxine?

Les champignons filamenteux présentent un potentiel remarquable de production de métabolites secondaires. Ces composés sont fréquemment utilisés dans l’industrie pharmaceutique (la pénicilline, les statines...), mais certains de ces métabolites se révèlent toxiques pour l’Homme : les mycotoxines. Produites majoritairement par des moisissures des genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* qui contaminent de multiples matières premières, les mycotoxines sont les contaminants naturels les plus fréquemment retrouvés dans l’alimentation. Ces toxines sont très résistantes aux différents procédés de fabrication et de transformation des aliments, y compris la cuisson. Par exemple, le déoxynivalénol est encore stable à 120 °C, et n’est détruit qu’après un traitement à la chaleur de 210 °C pendant 30 minutes. De ce fait, les mycotoxines se retrouvent dans nos assiettes. La stratégie de lutte contre les mycotoxines doit donc reposer sur la prévention de la contamination fongique, et s’appliquer à tous les stades de production des aliments (pré-récolte, matières premières, aliments transformés...) [1].

Cette revue présente les mycotoxines réglementées en Europe : l’aflatoxine B1 (AFB1), le déoxynivalénol (DON), la fumonisine B1 (FB1), l’ochratoxine (OTA), la patuline (PAT), la zéaralénone (ZEN) et les alcaloïdes de l’ergot (AEs). Nous traiterons ensuite des deux défis à relever dans les prochaines années que représentent les nouveaux métabolites produits par les moisissures (formes modifiées, mycotoxines émergentes...), mais aussi les effets des mélanges (mélanges de mycotoxines mais aussi mélanges entre les mycotoxines et d’autres contaminants alimentaires).

Toxicité des mycotoxines réglementées

Certaines mycotoxines présentent une forte occurrence dans les denrées alimentaires, ainsi qu’une toxicité aiguë ou chronique sur différents organes [2,3]. De ce fait, la Commission Européenne a mis en place une réglementation visant à garantir une alimentation saine.








La fumonisine B1

Les fumonisines constituent une famille de mycotoxines de plus de 30 membres dont les plus répandues sont les fumonisines B1 et B2 (FB1 et FB2). Elles sont produites par des champignons des genres *Fusarium*, en particulier par ceux de la section *Liseola* comme *F. verticillioides* et *F. proliferatum*, qui contaminent principalement le maïs. Les fumonisines sont également produites par *Aspergillus niger* qui contamine le raisin (Fig. 1).

Dans l’Union Européenne (UE), la teneur maximale pour la somme FB1+FB2 est de 200 µg/kg pour les aliments transformés à base de maïs et les aliments destinés aux nourrissons et aux jeunes enfants. Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé les FB1 et FB2 dans le groupe 2B (« agent cancérigène possible ») [4]. Récemment, l’EFSA (European Food Safety Authority) a défini une dose journalière tolérable (DJT) de 2 µg/kg poids corporel/jour pour la somme FB1+FB2 [5]. En Europe, les expositions moyennes à la FB1 et à la FB2 s’élèvent respectivement à 29 et 15,8 ng/kg poids corporel/j chez les adultes ainsi qu’à 44,6 et 30,4 ng/kg poids corporel/j chez les enfants [6].

Après ingestion, peu de FB1 est retrouvée dans le plasma et les tissus, ce qui indique une faible absorption de la mycotoxine (environ 4 % de la dose ingérée) [7]. La FB2 est moins biodisponible que la FB1 et, proportionnellement, moins de FB2 est excrétée dans la bile. Chez des rats traités par gavage, la FB1 hydrolysée est excrétée dans l’urine. Alors que la FB1 est distribuée dans la plupart des tissus, le foie et les reins retiennent la majeure partie de la matière absorbée. De la FB1 non métabolisée est retrouvée dans les reins et le foie, comme l’indique la présence de sphinganine libre, un biomarqueur de la fumonisine [8,9].

En raison de sa structure biochimique proche de la sphinganine et de la sphingosine, la FB1 entre en compétition avec les céramides synthèses impliquées dans la synthèse *de novo* des sphingolipides complexes. La perturbation du métabolisme des sphingolipides inhibe un certain nombre de processus cellulaires tels que la fonction de la membrane, la croissance, la différenciation, et induit des lésions cellulaires et l’apoptose [10–12]. Des études récentes chez des souris exposées à 10 mg.kg⁻¹ de poids corporel/jour

Mycotoxine	Structure chimique	Champignons producteurs	Principales denrées contaminées	Principaux effets	Valeurs toxicologiques de référence (VTR) proposé par l'EFSA (ou par défaut le JEFCA)
Aflatoxine B1 (AFB1)		<i>Aspergillus</i> de la section <i>Flavi</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>	Arachides, noix, pistaches, autres fruits séchés Aliments pour bébés	Cancérogène pour l'Homme Génotoxique	Toxine cancérogène, pas de VTR (Schrenk et al 2020a)
Deoxynivalenol (DON)		<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. cerealis</i>	Cereals and cereal products (maize, wheat...) Bread Pasta Breakfast cereals Baby food	Vomissement Diarrhées Anorexie Réduction de la croissance animale Altération des organes (foie, rate, ganglions mésentériques, tractus gastro-intestinal) Immunotoxicité	Pour le DON ses formes modifiées DAR ⁽¹⁾ 8 µg/kg poids corporel/jour DJT ⁽²⁾ 1 µg/kg poids corporel/jour (Knutsen et al 2017)
Ochratoxine A (OTA)		<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i> or section <i>Nigri</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. nordicum</i>	Céréales, noix, fruits secs, cacao, café	Néphrotoxique (tumeurs rénales) Cancérogène chez les animaux et possiblement chez les humains	Toxine cancérogène, pas de VTR (Schrenk et al 2020b)
Zearalenone (ZEN)		<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. cerealis</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>F. incarnatum</i>	Blé, maïs, orge, avoine, seigle	Perturbateurs endocriniens (interaction avec les récepteurs des œstrogènes)	Pour la ZEN et ses formes modifiées DJT 0,25µg/kg poids corporel/jour (Steinkellner et al 2019)
Fumonisine B1 (FB1)		<i>Fusarium</i> section <i>Liseola</i> , <i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>Aspergillus niger</i>	Maïs (<i>Fusarium</i> spp.), raisin (<i>A. niger</i>)	Inhibition de la biosynthèse des sphingolipides Induction de l'apoptose dans le foie Tumorigénèse chez le rongeur Possiblement carcinogénique chez l'Homme	Pour la FB1 et ses formes modifiées DJT 2 µg/kg poids corporel/jour (Knutsen et al 2018)
Patuline (PAT)		<i>Byssosclamyces</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.	Fruits et spécialement les pommes et leurs produits dérivés Ensilage	Ulcération gastrointestinale Immunotoxicité Neurotoxicité	DJTMP ⁽³⁾ 0,4µg/kg poids corporel/ jour (Herman et al., 1999)
Alcaloïdes de l'ergot (EAs)		<i>Claviceps purpurea</i> , <i>C. fusiformis</i> , <i>C. africana</i> , <i>Neotyphodium</i> spp.	Seigle, blé, triticale, orge, millet, épeautre, maïs et avoine	Toxicité aiguë - convulsions, hémorragie utérine, avortement, neurotoxicité; toxicité chronique - vasoconstriction, ischémie et nécrose des extrémités (ergotisme)	DAR ⁽¹⁾ 1 µg/kg poids corporel/jour DJT ⁽²⁾ 0,6 µg/kg poids corporel/jour (Arcella et al., 2017)

⁽¹⁾DARf dose de référence aiguë, ⁽²⁾DJT dose journalière tolérable ⁽³⁾DJTMP dose journalière tolérable maximale provisoire

Figure 1. Généralités sur les mycotoxines réglementées.

montrent que la toxicité de cette mycotoxine implique également les récepteurs nucléaires tel que LXR α et β [13]. Les récepteurs LXR, également impliqués dans le métabolisme du cholestérol, interviennent dans la protection de cet organe contre la toxicité induite par la FB1.

Chez l'animal, plusieurs études décrivent des symptômes cliniques nombreux et variés comme des effets hépatotoxiques, néphrotoxiques, immunotoxiques et cancérogènes [14–16]. Certains de ces symptômes ont initialement été décrits comme étant spécifiques à une espèce animale comme, par exemple, les œdèmes pulmonaires et la dysfonction cardiaque chez le porc, ou les leucoencéphalopathies chez les chevaux [17]. Cependant, ces symptômes ont été par la suite décrits dans d'autres espèces animales [18].

Chez les humains, une corrélation entre la consommation de FB1+FB2 et une incidence accrue du cancer de l'œsophage a été établie [19]. De ce fait, les FB1 et FB2 ont été classées dans le groupe 2B par le CIRC [4]. L'exposition aux fumonisines provoque également des anomalies du tube neural et des défauts de développement *in utero* chez la souris, pouvant être évités par un apport en acide folique. Des études épidémiologiques rapportent de fortes incidences d'anomalies du tube neural dans certaines régions du monde où une exposition importante aux fumonisines a été documentée comme le Guatemala, l'Afrique du Sud ou la Chine [20].

L'aflatoxine B1

L'aflatoxine B1 (AFB1) est la plus puissante cancérogène naturelle. La famille des aflatoxines comprend outre l'AFB1, les AFB2, G1 et G2 auxquelles s'ajoutent les formes hydroxylées retrouvées dans le lait, les AFM1 et M2 [21]. Les aflatoxines sont produites par des champignons du genre *Aspergillus*, en particulier *A. flavus* et *A. parasiticus*, dans

certaines conditions environnementales de température et d'humidité élevées, fréquemment associées aux climats tropicaux et subtropicaux. Par conséquent, une grande variété de produits agricoles, principalement le maïs, l'arachide, les pistaches et autres fruits à coque sont des sources potentielles d'exposition à cette toxine [22]. En outre, les simulations montrent que le changement climatique devrait augmenter l'occurrence de l'AFB1 dans des régions telle que l'Europe, considérées auparavant comme exemptes [23,24].

Dans l'UE, la dose maximale d'AFB1 varie entre 8 et 2 µg/kg pour les aliments destinés à la consommation des adultes (8 pour les arachides destinées à être soumises à un tri, et 2 pour les céréales). Pour les aliments destinés aux enfants en bas âge et aux nourrissons, la dose maximale est fixée 0,1 µg/kg [22]. La réglementation en termes de contaminants est toujours plus sévère pour les nourrissons car d'une part, la quantité d'aliment qu'ils ingèrent relativement à leur poids est plus élevée que les adultes, et d'autre part ils sont considérés comme une population fragile [22]. L'AFB1 est une molécule cancérogène et donc classée dans le groupe 1 (« agent cancérogène avéré ») par le CIRC [4]. Comme pour toute substance cancérogène, il n'y a pas de valeur toxicologique de référence. En Europe, l'exposition moyenne aux aflatoxines et notamment à l'AFB1 varie entre 0,22 et 0,49 ng/kg poids corporel/jour. Pour les populations européennes les plus exposées, elle est comprise entre 1,35 et 3,25 ng/kg poids corporel/jour.

L'AFB1 est principalement absorbée dans l'intestin grêle. Le taux maximal d'absorption est observé au niveau du duodénum et peut atteindre 90 % chez les animaux monogastriques. Chez l'humain, la concentration plasmatique maximale d'AFB1 est observée 1 h après une intoxication par voie orale, suggérant une absorption rapide et efficace de la toxine. Liée à l'albumine plasmatique, l'AFB1 atteint le foie par le système porte et est métabolisée par les cytochromes P450 (CYP1A2, 3A4) en AFB1 8,9-époxyde (AFBO). Suite à

sa métabolisation par le CYP450 dans le foie, l'AFB1 est capable d'induire la génération et l'accumulation de ROS tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), entraînant un stress oxydatif. Hautement réactive et instable, l'AFBO se lie facilement à l'ADN et aux protéines, entraînant la formation d'adduits [25]. L'AFB1 est également métabolisée à travers le système P450 en un certain nombre de produits d'hydroxylation moins toxiques tels que l'AFM1 [22]. De plus, l'AFBO peut se conjuguer avec le glutathion lors d'une réaction catalysée par la glutathion-S-transférase. L'AFBO conjuguée est excrétée dans la bile, favorisant ainsi la détoxification de l'AFB1 [26,27]. L'AFB1 et ses métabolites formés sont caractérisés par un profil cinétique diphasique. Ils sont d'abord éliminés rapidement du plasma avec une première demi-vie égale à 2,7 h. Un second schéma d'excrétion, plus long, lui succède avec une demi-vie terminale égale à 64,4 h [22]. Après excrétion biliaire et passage entéro-hépatique, l'AFB1 et ses métabolites sont excrétés dans les urines et les fèces tandis que l'AFM1 est excrétée dans le lait [28,29].

La cancérogénicité hépatique est la principale conséquence de l'exposition et de la métabolisation de l'AFB1. La formation d'adduits à l'ADN conduit à l'apparition de mutations au niveau de gènes tels que le gène p53 suppresseur de tumeurs, favorisant ainsi la prolifération des cellules anormales et l'apparition d'hépatocarcinome [30]. L'AFB1 peut également induire un stress oxydatif favorisant l'induction de lésions à l'ADN [31].

Une intoxication aiguë à l'AFB1 provoque de graves lésions hépatiques, des douleurs abdominales, des diarrhées, un ictère, une anorexie et potentiellement la mort. Par exemple, en 2004 et 2005, au Kenya, une intoxication aiguë à l'AFB1 a causé près de 150 décès [32]. L'exposition à des faibles doses d'aflatoxines sur une longue période (aflatoxicose chronique) induit chez l'Homme le développement d'hépatocarcinome [27], qui est fortement augmenté par la co-exposition au virus de l'hépatite B [22]. En outre, d'autres effets chroniques comme l'immunosuppression et la tératogénicité ont été décrits [33]. L'exposition fœtale et néonatale à l'AFB1 représente par ailleurs l'un des principaux facteurs de risque de retard de croissance et de baisse du taux de natalité [34]. Enfin, l'AFB1 favorise l'induction d'entéropathies, conduisant ainsi au rachitisme chez les enfants.

Le déoxynivalénol

Le déoxynivalénol (DON) fait partie de la famille des trichothécènes. Il est produit par des moisissures du genre *Fusarium* et en particulier par les espèces *F. graminearum* et *F. culmorum*. Le DON se retrouve principalement dans les céréales (blé, orge, maïs ...) et leurs produits dérivés (Tableau 1).

La Commission Européenne a limité la teneur en DON pour les céréales et les produits dérivés à 0,2 mg/kg pour l'alimentation infantile et 1,75 mg/kg pour l'alimentation destinée à la population générale. La DJT pour le DON et ses formes dérivées (3-Ac-DON, 15-Ac-DON et DON-3 glucoside) a été fixée par l'EFSA à 1 µg/kg de poids corporel/jour [35]. L'exposition au DON et à ses formes dérivées en Europe varie entre 0,2 µg/kg de poids corporel/jour chez les adultes et 2,9 µg/kg de poids corporel/jour chez les enfants. Chez les

enfants la valeur d'exposition dépasse donc la DJT fixée par l'EFSA, montrant ainsi que l'exposition à cette toxine reste un problème de sécurité sanitaire des aliments pour cette partie de la population. L'exposition importante des enfants s'explique par leur forte consommation de nourriture à base de céréales et par un apport de nourriture journalier par kilogramme de poids corporel plus important que chez les adultes [35]. Le CIRC a classé le DON dans le groupe 3 (« non classifiable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme »).

Le DON est absorbé dans la partie supérieure de l'intestin. Le taux d'absorption du DON au niveau du jéjunum varie entre 52,7 et 100 % [6]. Le DON est détectable dans le plasma 30 minutes après intoxication par voie orale, suggérant une absorption rapide de la toxine à travers la barrière intestinale de l'intestin proximal [36,37]. Le métabolisme du DON est réalisé selon deux voies différentes : la biotransformation tissulaire via un passage entéro-hépatique, et par le microbiote intestinal [38]. La voie principale de métabolisation du DON au niveau tissulaire est la glucuronidation. Après absorption au niveau de la muqueuse intestinale, le DON est métabolisé en DON-(3-8-15)-glucuronide qui a une toxicité réduite [39,40]. La de-époxydation du DON par le microbiote a lieu dans la partie inférieure du tractus digestif (le colon) et conduit à une forme détoxifiée : le de-époxy-déoxynivalénol ou DOM-1 [41]. Chez l'Homme, une interaction possible entre le DON et l'albumine sérique augmenterait sa demi-vie [42]. Après excrétion biliaire, le passage entéro-hépatique et la biotransformation dans le tractus digestif, le DON et ses métabolites sont excrétés dans les urines et les fèces.

L'hydro-solubilité du DON ainsi que son faible poids moléculaire lui permettent de traverser les membranes pour pénétrer dans les cellules, dans lesquelles il cible la sous-unité 60S des ribosomes [43]. La fixation du DON au niveau du centre peptidyl transférase du ribosome induit un « stress ribotoxique » et génère une cascade de phosphorylations débouchant sur l'activation des *mitogen activated protein kinases* (MAPKs) [44] impliquée dans de nombreux processus cellulaires. Par exemple, les MAPK sont directement responsables de la réponse inflammatoire associée à l'exposition au DON; elles sont aussi impliquées dans les phénomènes apoptotiques induits par cette toxine [45,46]. Outre l'activation des MAPK, la fixation du DON au niveau du ribosome génère l'arrêt de la synthèse protéique et un effet pro-oxydant marqué par une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène [47]. L'accumulation de ROS induite par le DON provoque la déstabilisation des membranes cellulaires, ou encore l'altération de l'ADN et des protéines, et peut mener à l'apoptose [48].

L'intoxication aiguë au DON provoque des vomissements, d'où son appellation « vomitoxine ». A des doses plus faibles, elle induit une anorexie [35]. Ces effets résultent d'une action directe sur le cerveau avec l'activation des facteurs anorexigènes (POMC et CART) et d'une action indirecte sur le tractus gastro-intestinal via les cellules entéroendocrines et la sécrétion de plusieurs hormones intestinales telles que la cholécystokinine, le peptide YY, le glucagon-like peptide 1, le peptide inhibiteur gastrique et la 5-hydroxytryptamine [49].

Dans plusieurs pays (Inde, Chine, Japon...), l'ingestion de DON a provoqué des mycotoxicoses aiguës chez l'Homme, caractérisées par des nausées, des vomissements, des

douleurs abdominales ou encore des diarrhées [50,51]. En 2019, un cas d'intoxication aiguë au DON a été décrit dans une école primaire en Chine. La présence de 16 mycotoxines dans l'alimentation des enfants a été détectée ainsi que des doses de DON pouvant atteindre 6,86 mg/kg d'aliment, dose bien supérieure à la limite autorisée [52].

L'exposition au DON est responsable d'effets délétères dans l'intestin avec l'observation de lésions microscopiques, une diminution du nombre et de la taille des villosités et un défaut de la fonction de barrière dans l'intestin grêle [53,54]. Ces phénomènes s'accompagnent souvent de la perte de l'expression des protéines des jonctions serrées ainsi qu'une exacerbation de l'apoptose dans le tissu intestinal [55,56]. Récemment, nous avons établi un lien entre l'exposition à ce contaminant et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Dans un modèle rongeur de colite induite chimiquement, nous avons montré que l'exposition alimentaire au DON induisait une apparition plus rapide des symptômes et exacerbait les signes cliniques (diarrhées, présence de sang dans les selles, perte de poids) [46].

L'étude de l'exposition chronique au DON sur le système immunitaire a surtout été faite grâce à l'utilisation de modèles animaux. Le DON augmente la réponse pro-inflammatoire à la fois dans les cellules épithéliales intestinales et dans les cellules immunitaires. Au niveau intestinal, le DON exacerbe l'inflammation en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8 après l'activation des MAPK et de la PKR [57]. Dans la circulation systémique, le DON augmente la sécrétion d'immunoglobulines et module la réponse immunitaire [58–60].

L'ochratoxine A

L'ochratoxine A (OTA) est la mycotoxine la plus répandue de la famille des ochratoxines. Elle a été identifiée en 1965 comme un métabolite secondaire d'*Aspergillus ochraeus*, puis plus tard, d'autres *Aspergillus* des sections *circumdati* et *nigri* ainsi que *Penicillium verrucosum* et *P. nordicum* [61]. Des dérivés de l'OTA (OTB, OT α et OTC) peuvent être également produits par les moisissures mais de façon minoritaire.

Les principaux aliments contribuant à l'exposition chronique à l'OTA sont les céréales et leurs produits dérivés, les conserves de viande, les fromages, les raisins, le café, le cacao et leurs sous-produits (Tableau 1). En Europe, l'exposition moyenne à l'OTA varie entre 0,64 et 17,79 ng/kg poids corporel/jour. Pour les populations les plus exposées, elle est comprise entre 2,4 et 51,69 ng/kg poids corporel/jour. La Commission Européenne a fixé des niveaux maximums pour l'OTA de 10 μ g/kg dans les denrées alimentaires telles que les céréales, les fruits secs ou encore les noix. Sur la base de preuves obtenues chez l'animal, l'OTA est classée dans le groupe 2B (« possiblement cancérigène pour l'Homme »). Cependant, de nouvelles données suggèrent que cette mycotoxine peut être génotoxique et endommager directement l'ADN, et être cancérigène pour le rein. L'EFSA n'a donc établi aucune valeur toxicologique de référence pour cette toxine [62].

L'OTA est principalement absorbée dans l'intestin grêle. Le taux maximal d'absorption (85 % chez l'Homme) est observé au niveau du jéjunum [63]. L'OTA se lie à l'albumine

plasmatique rendant son excrétion difficile. Sa demi-vie est d'environ 35 jours [64]. L'OTA est métabolisée notamment en OTA α par les carboxypeptidases de la microflore intestinale. Après excrétion biliaire et passage entéro-hépatique, l'OTA et ses métabolites sont excrétés dans les urines et les fèces.

L'OTA a une structure similaire avec la phénylalanine et entre en compétition avec celle-ci pour les sites de liaison enzymatiques qui l'utilisent comme substrat. Elle inhibe la phénylalaninyl-ARNt synthétase avec pour conséquence une diminution de la synthèse des protéines. L'OTA inhibe aussi la respiration mitochondriale, induisant une déplétion d'ATP cellulaire, une perturbation de l'homéostasie du calcium, une peroxydation des lipides et des dommages oxydatifs des macromolécules [65]. Même si le(s) mode(s) d'action expliquant sa cancérogénicité sont toujours en débat [61], les études chez l'animal montrent que l'OTA est principalement néphrotoxique et cancérigène [66]. La question critique de la génotoxicité de l'OTA est controversée. Certains résultats suggèrent qu'elle cause des dommages à l'ADN indirectement via le stress oxydatif. Cependant, aucune preuve de dommages oxydatifs sur l'ADN ou de peroxydation des lipides n'a été mise en évidence. Le mode d'action qui explique cette cancérogénicité n'est donc pas complètement démontré, en particulier le mode de formation des adduits à l'ADN [62]. L'exposition des porcs et poulets à l'OTA entraîne une néphropathie. Chez l'Homme, il a été suggéré que l'OTA était impliquée dans la néphropathie endémique des Balkans, mais des données récentes indiquent que cette pathologie serait plutôt due à l'acide aristolochique [67]. De même, l'implication de l'OTA dans la néphropathie interstitielle chronique observée en Afrique du Nord demande à être confirmée [61,68].

La zéaralénone

La zéaralénone (ZEN) est synthétisée par certains champignons du genre *Fusarium* qui contaminent fréquemment les cultures telles que le maïs, l'orge, le blé, l'avoine et le seigle, en particulier dans les régions tempérées [69]. La ZEN peut être biotransformée en de nombreuses formes modifiées (voir paragraphe III. A. 1.) avec des toxicités variables.

Les niveaux maximaux tolérés de ZEN dans les aliments destinés à la consommation humaine sont fixés à 20 μ g/kg dans les aliments pour bébés et nourrissons, à 100 μ g/kg dans les snacks à base de maïs et les céréales pour petit déjeuner, et à 75 μ g/kg dans les céréales autres que le maïs. Les principaux aliments contribuant à l'exposition chronique à la ZEN sont les céréales et leurs produits dérivés, le chocolat et certains fruits (Tableau 1). En Europe, l'exposition moyenne à la ZEN varie entre 5,9 et 25,50 ng/kg poids corporel/jour. Pour les populations les plus exposées (les nourrissons et jeunes enfants), elle est comprise entre 11,5 et 46,2 ng/kg poids corporel/jour [70]. La dose journalière tolérable établie par l'EFSA pour la ZEN et ses formes modifiées est de 0,25 μ g/kg poids corporel/jour. Cette toxine est classée dans le groupe 3 (« non classifiable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme ») par le CIRC.

La ZEN est surtout absorbée dans l'intestin proximal (61–85 %) où elle est rapidement métabolisée [6]. Comme déjà mentionné, la ZEN peut être transformée en une famille relativement complexe de métabolites qui partagent

le même mode d'action, et dont certaines sont jusqu'à 60 fois plus puissantes que la molécule mère [71]. En raison de la similarité structurale entre la ZEN et l'hormone 17- β -œstradiol (E2), la ZEN est capable de se lier aux récepteurs d'œstrogènes, exerçant un effet hyperœstrogénique et de perturbation endocrinienne [72]. Cependant, à des concentrations élevées, la toxicité de la ZEN est indépendante de la signalisation des œstrogènes et induit un stress oxydatif élevé qui conduit à un effet cytotoxique [73]. La ZEN a donc une toxicité pléiotropique qui dépend de l'organe cible (réagissant ou non aux œstrogènes) et des conditions d'exposition (faible ou forte dose) [74]. L'effet toxique de la ZEN a beaucoup été étudié, en utilisant le porc comme modèle en raison de sa sensibilité et des mécanismes de réponses similaires à l'Homme [75]. La sensibilité du porc à la ZEN s'explique par sa capacité à convertir la ZEN en α -zéaralénol, plus actif sur le plan œstrogénique [76]. Les effets toxiques de la ZEN sur le système reproducteur sont bien connus et comprennent la stérilité, les dysfonctionnements hormonaux et l'hyperplasie du tractus reproducteur chez les animaux d'élevage et de laboratoire [69]. Chez l'Homme, l'exposition à la ZEN a été associée à l'hyperplasie de l'endomètre, tandis que le métabolite ZEN α -zéaralénol pourrait être capable de favoriser le développement du cancer du sein. La ZEN est également toxique pour d'autres organes, tels que le foie, les cellules immunitaires et l'intestin [77–79].

La patuline

La patuline (PAT) est principalement produite par *Penicillium expansum*, mais peut également être synthétisée par *P. crustosum*, *P. patulum* et *Aspergillus clavatus*. Les pommes et les produits à base de pomme constituent les sources principales de contamination de l'alimentation humaine par la PAT, mais d'autres denrées peuvent également être contaminées par cette mycotoxine (Tableau 1). L'exposition à la PAT peut fortement varier en fonction de la quantité d'aliment à risque consommé par l'Homme et notamment par les jeunes enfants. En effet, l'exposition moyenne à la PAT varie entre 0,63 et 21,2 ng/kg poids corporel/jour chez l'adulte et entre 1,21 et 39,3 ng/kg poids corporel/jour chez l'enfant [70]. Du fait de l'exposition plus importante des nourrissons et jeunes enfants à des denrées potentiellement contaminées par la PAT (compote, jus de fruits, ...), les teneurs maximales de PAT autorisées sont de 50 μ g/kg de jus de fruit ou de nectar pour les adultes et de 10 μ g/kg pour les produits destinés aux très jeunes populations (nourrissons et enfants). Fondée sur une dose sans effet de 43 μ g/kg poids corporel/jour, une DJT de 0,4 μ g/kg poids corporel/jour a été établie [80]. La PAT est classée dans le groupe 3 (« non classifiable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme ») du CIRC.

Des études chez l'animal ont montré qu'environ 50 % de la PAT était principalement absorbée au niveau de l'estomac et se retrouvait rapidement dans la circulation sanguine. Après ingestion, la majeure partie de la PAT est éliminée par conjugaison avec le glutathion intracellulaire. La PAT est retrouvée dans les fèces et est métabolisée soit au niveau du foie soit dans les reins, et se retrouve dans la circulation sanguine avant d'être excrétée dans les urines [81].

En raison de ses propriétés inhibitrices sur la croissance des bactéries Gram positives et Gram négatives, elle a été

utilisée en médecine thérapeutique vétérinaire et humaine comme antibiotique. Cependant, du fait de sa toxicité pour l'Homme et les animaux, son utilisation comme tel a été suspendue [82]. Le mécanisme principal associé à la toxicité de la PAT implique la formation de composés covalents contenant des composés sulfhydriles tels que le glutathion. La réduction du glutathion induit la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) dans les cellules. Des niveaux excessifs de ROS perturbent non seulement l'équilibre dynamique entre les processus pro- et anti-oxydatifs, mais aussi l'état physiologique normal de la cellule. La PAT induit ainsi l'apoptose via le stress oxydatif. L'exposition à la PAT diminue la viabilité cellulaire dans différentes lignées cellulaires humaines (Caco-2, HCT116, HEK293...) et est associée à une nécrose dans ces cellules [83,84]. Une toxicité aiguë est observée suite à l'ingestion de doses élevées avec notamment des atteintes rénales et pulmonaires (congestion), des ulcérations, convulsions, œdèmes et une altération du tractus gastro-intestinal avec l'apparition d'inflammation et des vomissements [85]. L'ingestion de PAT conduit à des désordres intestinaux notamment chez les enfants chez lesquels des épidémies de diarrhées ont été attribuées à la consommation de fruits contaminés [86].

Les alcaloïdes de l'ergot

L'ergotisme, due aux alcaloïdes de l'ergot (AEs), est la mycotoxicose la plus anciennement connue en France. Les AEs ont été utilisés en médecine chinoise pendant plus de 500 ans. Ils ont également provoqué de nombreux cas d'intoxication au Moyen Âge [87]. L'ergotisme se manifestait en deux formes, une gangreneuse nommée « feu de Saint-Antoine », « feu sacré » ou « mal des ardents » [88], et une convulsive, appelée « mal de Saint-André » [88]. La dernière épidémie d'ergotisme en France aurait eu lieu à Pont Saint-Esprit vers les années 1950 [86]. Les AEs sont produits principalement par des moisissures du genre *Claviceps*. Le mycélium du *Claviceps* forme une masse noire (sclérote) qui ressemble à l'ergot du coq, d'où son nom. Ces sclérotés sont riches en AEs. Plus de 50 AEs ont été identifiés, et la plupart présente une structure ergoline tétracyclique (Tableau 1). Les formes les plus représentées sont l'ergométrine, l'ergotamine, l'ergosine, l'ergocristine, l' α -ergocryptine et l'ergocornine [89].

Les AEs ont été détectés dans les aliments à base de céréales, les farines de seigle et de blé, ou encore le pain. Des concentrations jusqu'à 3280 μ g/kg d'aliment ont été retrouvées. L'exposition chez l'Homme peut varier entre 0,02 et 0,98 μ g/kg poids corporel/j. Les enfants jusqu'à 10 ans sont 2 à 3 fois plus exposés que les adultes [90]. A l'heure actuelle, la réglementation pour l'alimentation humaine concerne seulement la quantité de sclérotés (maximum 0,5 g/Kg pour les céréales butes), et non les AEs proprement dits.

La toxicité des AEs est due à leur similarité structurale avec la dopamine, la noradrénaline, l'adrénaline et la sérotonine, leur permettant ainsi de se lier aux récepteurs des amines et d'agir à la fois comme agonistes et antagonistes [91]. Plus récemment, il a été montré que les ergochromes (pigments jaunes biphenyl également présents dans les sclérotés) sont également toxiques. Leur toxicité, évaluée sur des lignées cellulaires humaines, est cependant

moindre que celle des AEs [92]. L'intoxication par les AEs provoque des désordres cardiovasculaires, la vasoconstriction, la gangrène, des perturbations de la reproduction, des accouchements prématurés, l'agalactie ou des altérations neurotoxiques (anorexie, vertige et convulsions).

Les challenges pour la recherche dans le domaine des mycotoxines

Malgré le fait que certains mécanismes d'action restent à élucider, la toxicité des mycotoxines réglementées est relativement bien documentée. En revanche, de "nouvelles" mycotoxines ont récemment été mise en lumière (formes modifiées, mycotoxines émergentes...). Elles sont encore très mal connues et représentent un vrai challenge pour la recherche. L'étude des mélanges, à la fois ceux entre mycotoxines mais aussi ceux entre les mycotoxines et d'autres contaminants alimentaires représente un autre challenge pour la recherche en toxicologie et en santé humaine.

Les autres mycotoxines

Outre les mycotoxines réglementées, on retrouve dans l'alimentation d'autres mycotoxines, telles que des formes chimiquement modifiées, ou des mycotoxines dites « émergentes ». Ces formes sont à présent détectables grâce aux avancées dans les méthodes analytiques. En effet, l'utilisation de techniques telles que la chromatographie liquide haute performance et la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS) permettent une détection et une quantification plus sensible et plus large des mycotoxines.

Les formes modifiées

De nombreuses modifications des formes "natives" des mycotoxines ont été décrites [93,94]. Ces formes modifiées peuvent être issues d'une association à des matrices (liaison covalente avec l'amidon par exemple) ou de transformations biologiques ou chimiques (oxydation, réduction, hydrolyse ou conjugaison). Les transformations biologiques se font au sein de la plante, du champignon ou de l'animal/Homme et permettent la métabolisation et l'élimination de la toxine. Les transformations chimiques font suite à des procédés de nettoyage ou à des procédés industriels de transformation

des céréales [95] (Fig. 2). Le challenge actuel est de connaître la toxicité de ces formes modifiées. En effet, certaines formes modifiées peuvent être plus toxiques que la forme native, comme c'est le cas pour la ZEN dont certaines formes modifiées ont un fort pouvoir oestrogénique (Fig. 3).

D'autres mycotoxines modifiées sont cependant moins toxiques que les formes natives [39]. C'est le cas par exemple lors de biotransformation bactériennes conduisant à la formation de deepoxy-DON (ou DOM-1), d'épi-DON ou d'OTA α [96,97]. Cette stratégie de détoxification est d'ailleurs utilisée en alimentation animale.

Les formes glycosylées et sulfatées produites par les plantes sont généralement moins toxiques que les formes parentes. C'est par exemple le cas du DON-glucoside, des T2/HT2-glucoside ou de la ZEN glucoside ou sulfatée [79,98,99]. Cependant, ces formes modifiées peuvent être hydrolysées pendant la digestion avec un relargage de la molécule native plus toxique [100–102]. La retransformation de ces molécules en leur forme native engendre donc un risque de sous-estimation de la concentration réellement ingérée [93].

Il est donc important d'avoir à la fois des données sur l'occurrence et sur le métabolisme de chaque forme modifiée des mycotoxines, afin de pouvoir estimer leur impact sur la santé humaine ou animale.

Les mycotoxines émergentes

Outre les mycotoxines réglementées décrites au début de cette revue, de nombreux autres métabolites secondaires sont produits par les moisissures. De « nouvelles » mycotoxines appelées « mycotoxines émergentes » ne sont pas réglementées, ni détectées en routine. Elles existent depuis toujours et suscitent aujourd'hui un intérêt croissant. Parmi elles, les plus fréquentes sont les enniatines (ENN), la beauvéricine (BEA), l'aurofusarine (AFN) et la culmorine, la butenolide, l'acide fusarique, la moniliformine, la fusaproliférine et l'émodine (EMO). Elles sont produites par des champignons du genre *Fusarium*, exception faite de l'EMO qui est produite par des espèces d'*Aspergillus* [103].

Les données d'occurrence de ces toxines sont encore limitées mais les premières études suggèrent qu'on les retrouve fréquemment. Par exemple, sur la période 2010-2014, les ENN et la BEA ont respectivement été détectées

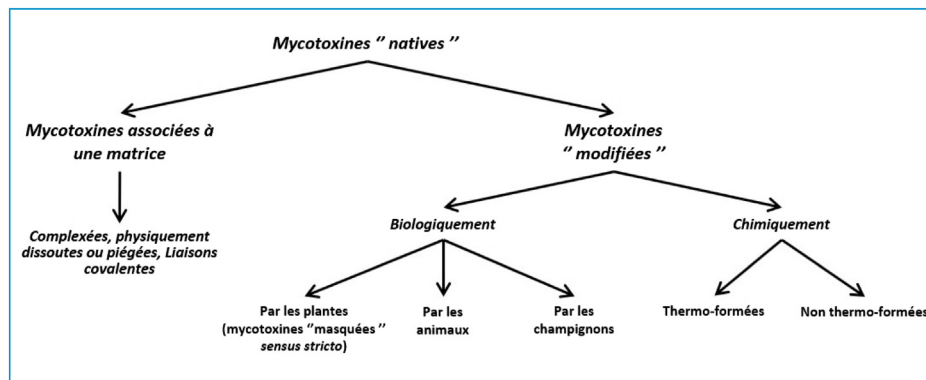


Figure 2. Nomenclature des différentes formes de mycotoxines modifiées (adaptée de Pierron et al., 2016a [126]; Rychlik et al., 2014 [94]).

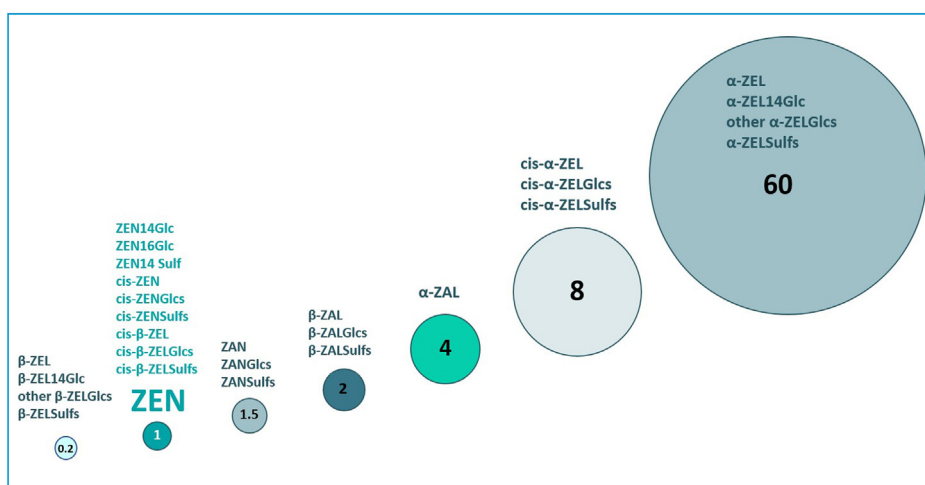


Figure 3. Estimation du potentiel oestrogénique de la zéaralénone et de ses formes modifiées.

en Europe dans 63 % et 80 % des aliments et dans 24 % et 46 % des céréales non transformées [104].

Des études récentes sur la toxicité de ces nouveaux métabolites mettent en lumière des activités antimicrobiennes pour l'ENN, une augmentation de l'apoptose et de la fragmentation de l'ADN pour la BEA, des effets cytotoxiques pour la fusaproliférine ou encore un défaut de la fonction de barrière sur des cellules intestinales porcines pour l'AFN [105–107]. Plus d'efforts doivent être déployés dans les prochaines années pour mieux comprendre cette nouvelle classe de métabolites présents dans l'alimentation.

Les mélanges

La toxicité des mycotoxines, comme celle des autres contaminants, a le plus souvent été étudiée de manière individuelle [60,108]. Si cette approche est utile pour connaître le profil toxicologique d'un élément isolé et déterminer des seuils de toxicité à des fins de réglementation, elle ne permet pas en revanche d'apprécier les dangers et les risques associés à des cocktails de contaminants. Cette situation nous a conduit ainsi que d'autres équipes à étudier la toxicité des mélanges et à déterminer comment les contaminants interagissent entre eux. En effet, la toxicité des mélanges de contaminants alimentaires ne peut être simplement déterminée à partir de leurs toxicités individuelles.

Les mélanges de mycotoxines

En Europe, 75 à 100 % des échantillons alimentaires sont contaminés par plusieurs mycotoxines à la fois [1]. Par conséquent, les humains et les animaux sont généralement exposés à plusieurs mycotoxines [109,110]. Ceci s'explique par le fait que les moisissures toxigènes sécrètent en général plusieurs mycotoxines en même temps, et que plusieurs moisissures peuvent contaminer de façon simultanée ou séquentielle un même substrat alimentaire. Enfin, nos repas sont composés de plusieurs matières premières, chacune pouvant être contaminée par différentes toxines.

L'exposition simultanée à plusieurs mycotoxines peut aboutir à des effets toxiques combinés de type additif, antagoniste ou synergique [111]. Le seuil d'apparition d'effets

toxiques peut être franchi pour un mélange de mycotoxines alors que chacune des toxines est à des doses inférieures à son seuil de toxicité [112].

Comme pour d'autres contaminants, les principaux écueils à l'étude de la toxicité combinée des mycotoxines sont d'ordre méthodologique. En effet, détecter une interaction toxico-dynamique et la caractériser, nécessite d'abord de prédire de façon théorique une toxicité additive de référence, et ensuite de comparer la toxicité combinée observée à la toxicité additive prédite. La toxicité combinée du mélange est dite synergique si elle est plus marquée que la prédiction théorique d'additivité, et elle est dite antagoniste dans le cas contraire [109].

À l'aide de modèles mathématiques initialement développés pour analyser les interactions médicamenteuses, nous avons observé que les mélanges binaires et ternaires de toxines de *Fusarium* exerçaient des effets synergiques. Cette synergie a été observée sur plusieurs paramètres (cytotoxicité et sur réponse inflammatoire) en utilisant différents modèles (cellules épithéliales intestinales humaines et porcines, explants d'intestin, anses intestinales). La synergie est surtout observable à faibles concentrations. À des concentrations plus élevées, les combinaisons de mycotoxines montrent des effets additifs ou antagonistes [109,113,114]. Des synergies induites par des combinaisons binaires de toxines de *Fusarium* à faibles doses ont également été montrées par d'autres groupes pour l'hépatotoxicité et leur effet sur l'expression des enzymes de biotransformation, en utilisant une lignée d'hépatocytes humains [115].

Outre l'analyse des interactions entre mycotoxines réglementées, il est important d'analyser également les interactions entre les mycotoxines réglementées et les mycotoxines émergentes. Dans ce cadre-là, nous pouvons citer l'exemple de l'interaction entre le DON et les dix mycotoxines émergentes les plus représentées. En mesurant la viabilité cellulaire dans une lignée intestinale porcine (IPEC-1), les auteurs montrent que la toxicité combinée de tous leurs mélanges est similaire à celle du DON seul. Il semble donc que la co-occurrence des mycotoxines émergentes testées avec le DON n'exacerbe pas la toxicité de cette mycotoxine seule chez le porc [110]. En revanche, une

inhibition synergique de la différenciation des monocytes en macrophages, et une activité œstrogénique combinée de type synergique ont été identifiées pour la ZEN et la mycotoxine émergente alternariol, en utilisant des cellules de lignées humaines [116,117]. Ces résultats révèlent la complexité des interactions et démontrent que de faibles doses de mycotoxines peuvent montrer des effets synergiques. Ceci est d'un intérêt majeur puisque cette situation de faibles doses correspond aux conditions d'exposition les plus fréquentes des consommateurs. Actuellement, les évaluations des risques réalisées par les agences nationales et internationales commencent à prendre en compte les expositions multiples, mais uniquement par un effet additif avec éventuellement des facteurs de potentialisation [22,36,72]. Le challenge est maintenant de prendre en compte les synergies.

Les mélanges entre les mycotoxines et les autres contaminants alimentaires

Comme déjà évoqué, la multi-contamination des denrées alimentaires est la règle et non l'exception. L'Homme n'étant pas seulement exposé aux mycotoxines, il est important d'analyser plus globalement l'« exposome », terme qui englobe à la fois les expositions provenant de sources externes (contaminants alimentaires, aériens..) et internes (inflammation, infections et microbiote) [118]. De nombreux contaminants tels que les pesticides, les métaux lourds, des toxines... peuvent être présents dans notre alimentation mais la toxicité de ces mélanges commence seulement à être étudiée.

Du fait de leur utilisation, les pesticides se retrouvent fréquemment dans notre alimentation et peuvent donc se retrouver en interaction avec les toxines fongiques [108]. Une étude a montré que 62 % des échantillons d'un vin rouge provenant d'Espagne contenaient de l'AFB2 et du metalaxyl, un fongicide [119]. La ZEN a également été détectée en mélange avec des fongicides, des insecticides, ou des herbicides dans l'alimentation à destination des animaux [120].

Peu d'études ont cherché à connaître les effets de ces mélanges. Il a par exemple été démontré que le mélange ZEN et dichlorodiphényltrichloroéthane (DTT), un insecticide, augmente la production de testostérone par les cellules de Leydig. Ceci suggère que la co-exposition ZEN-DTT pourrait exacerber les effets néfastes sur la reproduction [121]. De même, chez la souris, une étude indique que l'hépatotoxicité induite par la PAT est significativement augmentée lorsqu'elle est en mélange avec du chlorpyrifos [122].

Les mycotoxines peuvent également se retrouver associées à des métaux lourds, des polluants environnementaux naturels mais également issus d'activités agricoles ou industrielles. Dans ce cadre, nous avons étudié l'association entre l'OTA et le cadmium, et montré que l'interaction entre ces deux contaminants dépend du type cellulaire étudié [123]. Au niveau intestinal, les résultats obtenus sur des cellules épithéliales intestinales humaines et sur des rongeurs montrent que, sur la fonction de barrière intestinale, les effets obtenus avec une co-contamination sont similaires aux effets de chaque contaminant pris individuellement [124].

Comme déjà évoqué, la néphropathie endémique des Balkans a d'abord été associée à l'exposition à l'OTA, mais des études récentes montrent que son étiologie serait plutôt due à l'exposition chronique à une toxine de plante, l'acide aristolochique [63]. Une étude chez le rongeur a par ailleurs démontré que l'OTA exacerbe la formation d'adduits à l'ADN causés par l'acide aristolochique dans les reins, suggérant que ce mélange peut également favoriser l'apparition de cancers [125].

Comme le montrent les exemples précédents, les études réalisées peuvent se grouper en deux grandes stratégies : certains de ces mélanges sont étudiés pour leur co-occurrence, tandis que d'autres mélanges sont étudiés car les composants ont la même cible. L'étude des interactions entre mycotoxines et autres contaminants alimentaires n'en est qu'à ses prémices. Le défi est d'étudier de manière plus systématique les mélanges auxquels nous sommes exposés et de caractériser les risques afférents. Dans le futur, une meilleure connaissance de la présence et de la toxicité des mélanges présents dans les aliments sera une condition préalable pour l'évaluation globale des risques pour la santé.

Conclusion générale

Parmi les contaminants alimentaires auxquels l'Homme est exposé tout au long de sa vie, les mycotoxines sont les plus abondants. Ces toxines représentent donc un problème majeur à la fois en termes de sécurité sanitaire des aliments mais également en terme de santé publique [1]. Au niveau européen, 7 toxines sont réglementées en considérant à la fois leur toxicité et leur occurrence dans les aliments. Les données européennes et françaises montrent que l'exposition de certaines catégories de la population et en particulier les enfants, conduit à un dépassement de valeurs toxicologiques de référence [70].

Si la toxicité des mycotoxines réglementées est relativement bien connue, la famille de ces toxines ne cesse d'augmenter avec la découverte régulière de nouveaux métabolites secondaires fongiques, comme les « formes modifiées » et les mycotoxines dites « émergentes ». L'étude et la caractérisation des effets de ces nouveaux métabolites sur la santé humaine présente un premier défi dans les prochaines années, d'autant plus qu'aucune réglementation ou recommandation n'existe pour ces toxines. De plus, comme nous sommes exposés via notre alimentation à de nombreux contaminants d'origines diverses, l'étude des mélanges de mycotoxines ou de mycotoxines associées à d'autres contaminants constitue un deuxième défi pour la recherche. En effet, un manque cruel de données toxicologiques dans ce domaine reste à combler afin de réviser la réglementation en prenant en compte les mélanges et non les effets des contaminants seuls. Enfin, dans cette revue, nous avons peu abordé les questions de l'évolution de nos habitudes alimentaires sur notre exposition aux mycotoxines ni celle du changement climatique sur la prévalence de ces toxines. En effet les nouveaux régimes alimentaires (bio, végétarien, végétalien...) ainsi que les techniques de production des aliments (transformation...) modifient le contenu de notre assiette, et ceci peut avoir une incidence sur notre exposition alimentaire aux mycotoxines. Par ailleurs, sachant que la température et l'humidité constituent des paramètres

importants pour la croissance des champignons et la production des mycotoxines, on s'attend à ce que le changement climatique ait une incidence sur la contamination des denrées par des mycotoxines.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Eskola M, Kos G, Elliott CT, Hajšlová J, Mayar S, Krska R. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited "FAO estimate" of 25. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2020;60:2773–89, <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570>.
- [2] Oswald IP, Coméra C. Immunotoxicity of mycotoxins. *Rev Méd Vét* 1998;149:585–90 [<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02692660>].
- [3] Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microb Rev* 2003;16:497–516, <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>.
- [4] Claeys L, Romano C, De Ruyck K, Wilson H, Fervers B, Korenjak M, et al. Mycotoxin exposure and human cancer risk: A systematic review of epidemiological studies. *Comprehensive Rev Food Sci Food Saf* 2020;19:1449–64, <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12567>.
- [5] Knutsen HK, Barregård L, Bignami M, Brüschweiler B, Ceccatelli S, Cottrill B, et al. Appropriateness to set a group health-based guidance value for fumonisins and their modified forms. *EFSA J* 2018;16:5172, <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5172>.
- [6] Schelstraete W, Devreese M, Croubels S. Comparative toxicokinetics of Fusarium mycotoxins in pigs and humans. *Food Chem Toxicol* 2020;137:111140, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2020.111140>.
- [7] Prelusky DB, Trenholm HL, Savard ME. Pharmacokinetic fate of ¹⁴C-labelled fumonisin B1 in swine. *Nat Toxins* 1994;2:73–80, <http://dx.doi.org/10.1002/nt.2620020205>.
- [8] Enongene EN, Sharma RP, Bhandari N, Voss KA, Riley RT. Disruption of sphingolipid metabolism in small intestines, liver and kidney of mice dosed subcutaneously with fumonisin B(1). *Food Chem Toxicol* 2000;38:793–9, [http://dx.doi.org/10.1016/s0278-6915\(00\)00065-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0278-6915(00)00065-x).
- [9] Martínez-Larranaga MR, Anadon A, Diaz MJ, Fernandez-Cruz ML, Martínez MA, Frejo MT, et al. Toxicokinetics and oral bioavailability of fumonisin B1. *Vet Hum Toxicol* 1999;41:357–62.
- [10] Bouhet S, Hourcade E, Loiseau N, Fikry A, Martinez S, Roselli M, et al. The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. *Toxicol Sci* 2004;77:165–71, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfh006>.
- [11] Riley RT, Merrill AHJ. Ceramide synthase inhibition by fumonisins: a perfect storm of perturbed sphingolipid metabolism, signaling, and disease. *J Lip Res* 2019;60:1183–9, <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.S093815>.
- [12] Terciolo C, Bracarense AP, Souto PCMC, Cossalter AM, Dopavogui L, Loiseau N, et al. Fumonisins at doses below EU regulatory limits induce histological alterations in piglets. *Toxins* 2019;11:548, <http://dx.doi.org/10.3390/toxins11090548>.
- [13] Régnier M, Goubeyre P, Pinton P, Napper S, Laffite J, Cossalter A-M, et al. Identification of Signaling Pathways Targeted by the Food Contaminant FB1: Transcriptome and Kinome Analysis of Samples from Pig Liver and Intestine. *Mol Nutr Food Res* 2017;61:1700433, <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201700433>.
- [14] Bouhet S, Oswald IP. The intestine as a possible target for fumonisin toxicity. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:925–31, <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200600266>.
- [15] Grenier B, Bracarense A-PFL, Schwartz HE, Trumel C, Cossalter A-M, Schatzmayr G, et al. The low intestinal and hepatic toxicity of hydrolyzed fumonisin B-correlates with its inability to alter the metabolism of sphingolipids. *Biochem Pharmacol* 2012;83:1465–73, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.02.007>.
- [16] Riley RT, Enongene E, Voss KA, Norred WP, Meredith FI, Sharma RP, et al. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 2001;109:301–8, <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.01109s2301>.
- [17] Haschek WM, Gumprecht LA, Smith G, Tumbleson ME, Constable PD. Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. *Environ Health Perspect* 2001;109:251–7, <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.01109s2251>.
- [18] He Q, Bhandari N, Sharma RP. Fumonisin B(1) alters sphingolipid metabolism and tumor necrosis factor alpha expression in heart and lung of mice. *Life Sci* 2002;71:2015–23, [http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205\(02\)01988-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205(02)01988-4).
- [19] Sun G, Wang S, Hu X, Su J, Huang T, Yu J, et al. Fumonisin B1 contamination of home-grown corn in high-risk areas for esophageal and liver cancer in China. *Food Addit Contam* 2007;24:181–5, <http://dx.doi.org/10.1080/02652030601013471>.
- [20] Marasas WFO, Riley RT, Hendricks KA, Stevens VL, Sadler TW, Gelineau-van Waes J, et al. Fumonisins disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J Nutr* 2004;134:711–6, <http://dx.doi.org/10.1093/jn/134.4.711>.
- [21] Kumar P, Mahato DK, Kamle M, Mohanta TK, Kang SG. Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. *Front Microbiol* 2017;7:2170, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.02170>.
- [22] Schrenk D, Bignami M, Bodin L, Chipman JK, del Mazo J, Grasl-Kraupp B, et al. Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA J* 2020;18:e06040, <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6040>.
- [23] Battilani P, Toscano P, Van Der Fels-Klerx HJ, Moretti A, Camardo Leggieri M, Brera C, et al. Aflatoxin B 1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Sci Rep* 2016;6:24328, <http://dx.doi.org/10.1038/srep24328>.
- [24] Bailly S, El Mahgubi A, Carvajal-Campos A, Lorber S, Puel O, Oswald IP, et al. Occurrence and identification of aspergillus section flavi in the context of the emergence of aflatoxins in french maize. *Toxins* 2018;10:525, <http://dx.doi.org/10.3390/toxins10120525>.
- [25] Ráduly Z, Szabó L, Madar A, Pócsi I, Csernoch L. Toxicological and Medical Aspects of Aspergillus-Derived Mycotoxins Entering the Feed and Food Chain. *Front Microbiol* 2020;10:2908, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.02908>.
- [26] Eaton DL, Gallagher EP. Mechanisms of Aflatoxin Carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1994;34:135–72, <http://dx.doi.org/10.1109/SIU.2012.6204811>.
- [27] Marchese S, Polo A, Ariano A, Velotto S, Costantini S, Severino L. Aflatoxin B1 and M1: Biological properties and their involvement in cancer development. *Toxins* 2018;10:214, <http://dx.doi.org/10.3390/toxins10060214>.
- [28] Groopman JD, Donahue PR, Zhu J. Aflatoxin metabolism in humans: Detection of metabolites and nucleic acid adducts in urine by affinity

- chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:6492–6, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.82.19.6492>.
- [29] Egnér PA, Yu X, Johnson JK, Nathasingh CK, Groopman JD, Kensler TW, et al. Identification of Aflatoxin M₁-N⁷-Guanine in Liver and Urine of Tree Shrews and Rats Following Administration of Aflatoxin B₁. *Chem Res Toxicol* 2003;16:1174–80, <http://dx.doi.org/10.1021/tx034106u>.
- [30] Yu J. Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins* 2012;4:1024–57, <http://dx.doi.org/10.3390/toxins4111024>.
- [31] Da Silva EO, Bracarense APFL, Oswald IP. Mycotoxins and oxidative stress: Where are we? *World Mycotoxin J* 2018;11:113–33, <http://dx.doi.org/10.3920/WMJ2017.2267>.
- [32] Okioma NM. The 2004 and 2005 Aflatoxin Tragedies in Kenya - A Case Study. *Mycotoxins: Detection Methods, Management. Public Health and Agricultural Trade* (Cromwell P) 2008:127–33, <http://dx.doi.org/10.1079/9781845930820.0000>.
- [33] Meissonnier GM, Pinton P, Laffitte J, Cossalter AM, Gong YY, Wild CP, et al. Immunotoxicity of aflatoxin B₁: impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;231:142–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2008.04.004>.
- [34] Gong YY, Watson S, Routledge MN. Aflatoxin Exposure and Associated Human Health Effects, a Review of Epidemiological Studies. *Food Saf* 2016;4:14–27, <http://dx.doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2015026>.
- [35] Knutsen HK, Alexander J, Barreg L, Ceccatelli S, Cottrill B, Dinovi M, et al. Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA J* 2017;15:e04718, <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4718>.
- [36] Grenier B, Applegate TJ. Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: Meta-analysis of published experiments in animals. *Toxins* 2013;5:396–430, <http://dx.doi.org/10.3390/toxins5020396>.
- [37] Maresca Marc. From the gut to the brain: journey and pathophysiological effects of the food-associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. *Toxins* 2013;5:784–820, <http://dx.doi.org/10.3390/toxins5040784>.
- [38] Payros D, Alassane-Kpembé I, Pierron A, Loiseau N, Pinton P, Oswald IP. Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms. *Arch Toxicol* 2016;90:2931–57, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-016-1826-4>.
- [39] Maul R, Warth B, Kant J-S, Schebb NH, Krska R, Koch M, et al. Investigation of the hepatic glucuronidation pattern of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in various species. *Chem Res Toxicol* 2012;25(12):2715–7, <http://dx.doi.org/10.1021/tx300348x>.
- [40] Uhlig S, Ivanova L, Fæste CK. Correction to Enzyme-Assisted Synthesis and Structural Characterization of the 3-, 8-, and 15-Glucuronides of Deoxynivalenol. *J Agric Food Chem* 2016;64:3732, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01413>.
- [41] Bracarense APFL, Pierron A, Pinton P, Gerez JR, Schatzmayr G, Moll W-D, et al. Reduced toxicity of 3-epi-deoxynivalenol and de-epoxy-deoxynivalenol through deoxynivalenol bacterial biotransformation: In vivo analysis in piglets. *Food Chem Toxicol* 2020;140:111241, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2020.111241>.
- [42] Maresca M. From the gut to the brain: journey and pathophysiological effects of the food-associated mycotoxin Deoxynivalenol. *Toxins* 2013;5:784–820 [<http://www.mdpi.com/2072-6651/5/4/784>].
- [43] Garreau de Loubresse N, Prokhorova I, Holtkamp W, Rodnina MV, Yusupova G, Yusupov M. Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome. *Nature* 2014;513:517–22 [nature1373710.1038/nature137371].
- [44] Pestka J. Deoxynivalenol: Mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch Toxicol* 2010;84:663–79, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-010-0579-8>.
- [45] Tardivel C, Airault C, Djelloul M, Guillebaud F, Barbouche R, Troadec JD, et al. The food born mycotoxin deoxynivalenol induces low-grade inflammation in mice in the absence of observed-adverse effects. *Toxicol Lett* 2015;232:601–11, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.12.017>.
- [46] Payros D, Ménard S, Laffitte J, Neves M, Tremblay-franco M, Luo S. The food contaminant, deoxynivalenol, modulates the Thelper/Treg balance and increases inflammatory bowel diseases. *Arch Toxicol* 2020;94:3173–84, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-020-02817-z>.
- [47] Mishra S, Dwivedi PD, Pandey HP, Das M. Role of oxidative stress in Deoxynivalenol induced toxicity. *Food Chem Toxicol* 2014;72:20–29 [[S0278-6915\(14\)00324-X10.1016/j.fct.2014.06.027](http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.06.027)].
- [48] Wang J, Jin Y, Wu S, Yu H, Zhao Y, Fang H, et al. Deoxynivalenol induces oxidative stress, inflammatory response and apoptosis in bovine mammary epithelial cells. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2019;103:1663–74, <http://dx.doi.org/10.1111/jpn.13180>.
- [49] Terciolo C, Maresca M, Pinton P, Oswald IP. Review article: Role of satiety hormones in anorexia induction by Trichothecene mycotoxins. *Food Chem Toxicol* 2018;121:701–14, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.034>.
- [50] Bhat RV, Beedu SR, Ramakrishna Y, Munshi KL. Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat production in Kashmir Valley, India. *Lancet* 1989;333:35–7, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)91684-x](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(89)91684-x).
- [51] Wu F, Groopman JD, Pestka JJ. Public health impacts of food-borne mycotoxins. *Annu Rev Food Sci Technol* 2014;5:351–72, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092431>.
- [52] Ruan F, Chen JG, Chen L, Lin XT, Zhou Y, Zhu KJ, et al. Food Poisoning Caused by Deoxynivalenol at a School in Zhuhai, Guangdong, China, in 2019. *Foodborne Pathog Dis* 2020;17(7):429–33, <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2019.2710>.
- [53] Akbari P, Braber S, Gremmels H, Koelink PJ, Verheijden KA, Garssen J, et al. Deoxynivalenol: a trigger for intestinal integrity breakdown. *FASEB J* 2014;28:2414–29, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.13-238717>.
- [54] Pinton P, Nougayrède J-P, Del Rio J-C, Moreno C, Marin DE, Ferrier L, et al. The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;237:41–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.003>.
- [55] Cheat S, Pinton P, Cossalter A-M, Cognie J, Vilariño M, Callu P, et al. The mycotoxins deoxynivalenol and nivalenol show in vivo synergism on jejunum enterocytes apoptosis. *Food Chem Toxicol* 2016;87:45–54, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.11.019>.
- [56] Pinton P, Braicu C, Nougayrède JP, Laffitte J, Taranu I, Oswald IP. Deoxynivalenol Impairs Porcine Intestinal Barrier Function and Decreases the Protein Expression of Claudin-4 through a Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Mechanism. *J Nutr* 2010;140:1956–62, <http://dx.doi.org/10.3945/jn.110.123919>.
- [57] Maresca M, Yahi N, Younes-Sakr L, Boyron M, Caporiccio B, Fantini J. Both direct and indirect effects account for the pro-inflammatory activity of enteropathogenic mycotoxins on the human intestinal epithelium: Stimulation of interleukin-8 secretion, potentiation of interleukin-1beta effect and increase in the transepithelial passage of commensals.

- sal bacteria. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;228:84–92, <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2007.11.013>.
- [58] Pinton P, Accensi F, Beauchamp E, Cossalter AM, Callu P, Grosjean F, et al. Ingestion of deoxynivalenol (DON) contaminated feed alters the pig vaccinal immune responses. *Toxicol Lett* 2008;177:215–22, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.01.015>.
- [59] Grenier B, Loureiro-Bracarense AP, Luciola J, Pacheco GD, Cossalter AM, Moll WD, et al. Individual and combined effects of subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins in piglets. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:761–71, <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201000402>.
- [60] Pestka JJ, Smolinski AT. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2005;8:39–69, <http://dx.doi.org/10.1080/10937400590889458>.
- [61] Malir F, Ostry V, Pfohl-Leszko A, Malir J, Toman J. Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins* 2016;8:12–5, <http://dx.doi.org/10.3390/toxins8070191>.
- [62] Schrenk D, Bodin L, Chipman JK, del Mazo J, Grasl-Kraupp B, Hogstrand C, et al. Risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA J* 2020;18:e06113, <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6113>.
- [63] Dietrich DR, Heussner AH, O'Brien E. Ochratoxin A: comparative pharmacokinetics and toxicological implications (experimental and domestic animals and humans). *Food Addit Contam* 2005;22(Suppl. 1):45–52, <http://dx.doi.org/10.1080/02652030500309327>.
- [64] Zingerte M, Silbernagl S, Gekle M. Reabsorption of the nephrotoxin ochratoxin A along the rat nephron in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:220–4.
- [65] Haschek WM, Voss KA. Mycotoxins. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00039-X>.
- [66] Heussner AH, Bingle LEH. Comparative ochratoxin toxicity: A review of the available data. *Toxins* 2015;7:4253–82, <http://dx.doi.org/10.3390/toxins7104253>.
- [67] Jadot I, Declèves A-E, Nortier J, Caron N. An Integrated View of Aristolochic Acid Nephropathy: Update of the Literature. *Int J Mol Sci* 2017;18(2):297, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18020297>.
- [68] Grosso F, Saïd S, Mabrouk I, Fremy JM, Castegnaro M, Jemali M, et al. New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. *Food Chem Toxicol* 2003;41:1133–40, [http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915\(03\)00067-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915(03)00067-X).
- [69] Zinedine A, Soriano JM, Molto JC, Manes J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem Toxicol* 2007;45:1–18, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.030>.
- [70] Vin K, Rivière G, Leconte S, Cravedi JP, Fremy JM, Oswald IP, et al. Dietary exposure to mycotoxins in the French infant total diet study. *Food Chem Toxicol* 2020;140:111301, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2020.111301>.
- [71] Steinkellner H, Binaglia M, Dall'Asta C, Gutleb AC, Metzler M, Oswald IP, et al. Combined hazard assessment of mycotoxins and their modified forms applying relative potency factors: Zearalenone and T2/HT2 toxin. *Food Chem Toxicol* 2019;131:110599, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2019.110599>.
- [72] Kowalska K, Habrowska-Górczyńska DE, Piastowska-Ciesielska AW. Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. *Environ Toxicol Pharmacol* 2016;48:141–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2016.10.015>.
- [73] Zheng W, Wang B, Li X, Wang T, Zou H, Gu J, et al. Zearalenone Promotes Cell Proliferation or Causes Cell Death? *Toxins* 2018;10:184, <http://dx.doi.org/10.3390/toxins10050184>.
- [74] Hennig-Pauka I, Koch F-J, Schaumberger S, Woechtl B, Novak J, Sulyok M, et al. Current challenges in the diagnosis of zearalenone toxicosis as illustrated by a field case of hyperestrogenism in suckling piglets. *Porcine Health Manag* 2018;4:18, <http://dx.doi.org/10.1186/s40813-018-0095-4>.
- [75] Kuiper-Goodman T, Scott PM, Watanabe H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul Toxicol Pharmacol* 1987;7:253–306, [http://dx.doi.org/10.1016/0273-2300\(87\)90037-7](http://dx.doi.org/10.1016/0273-2300(87)90037-7).
- [76] Binder SB, Schwartz-Zimmermann HE, Varga E, Bichl G, Michlmayr H, Adam G, et al. Metabolism of Zearalenone and Its Major Modified Forms in Pigs. *Toxins* 2017;9:56, <http://dx.doi.org/10.3390/toxins9020056>.
- [77] Chen P, Liu T, Jiang S, Yang Z, Huang L, Liu F. Effects of purified zearalenone on selected immunological and histopathologic measurements of spleen in post-weanling gilts. *Animal Nutr* 2017;3:212–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aninu.2017.04.008>.
- [78] Schmidt HS, Schulz M, Focke C, Becker S, Cramer B, Humpf H-U. Glucosylation of T-2 and HT-2 toxins using biotransformation and chemical synthesis: Preparation, stereochemistry, and stability. *Mycotoxin Res* 2018;34:159–72, <http://dx.doi.org/10.1007/s12550-018-0310-9>.
- [79] Soler L, Stella A, Seva J, Pallarés FJ, Lahjouji T, Bulet-Schiltz O, et al. Proteome changes induced by a short, non-cytotoxic exposure to the mycoestrogen zearalenone in the pig intestine. *J Proteomics* 2020;224:103842, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103842>.
- [80] Rychlik M, Kircher F, Schusdziarra V, Lippl F. Absorption of the mycotoxin patulin from the rat stomach. *Food Chem Toxicol* 2004;42:729–35, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2003.12.015>.
- [81] Puel O, Galtier P, Oswald IP. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins* 2010;2:613–31, <http://dx.doi.org/10.3390/toxins2040613>.
- [82] Boussabbeh M, Ben Salem I, Prola A, Guilbert A, Bacha H, Abid-Essefi S, et al. Patulin induces apoptosis through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress pathway. *Toxicol Sci* 2015;144:328–37, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfu319>.
- [83] Tannous J, Snini SP, El Khoury R, Canlet C, Pinton P, Lippi Y, et al. Patulin transformation products and last intermediates in its biosynthetic pathway, E- and Z-ascladiol, are not toxic to human cells. *Arch Toxicol* 2016;91:2455–67, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-016-1900-y>.
- [84] Mahfoud R, Maresca M, Garmy N, Fantini J. The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;181:209–18, <http://dx.doi.org/10.1006/taap.2002.9417>.
- [85] Lewis SA, Berg JR, Kleine TJ. Modulation of epithelial permeability by extracellular macromolecules. *Physiol Rev* 1995;75:561–89, <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.1995.75.3.561>.
- [86] Richard JL. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *Int J Food Microbiol* 2007;119:3–10, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.019>.
- [87] Ghysel M, Trotin F. Hallucinogen alkaloid derivatives from Ergot and Morning Glory. *Ann Toxicol Anal* 2004;16:65–75, <http://dx.doi.org/10.1051/ata/2004026>.
- [88] Guitard E-H. Le mal des Ardents ou le feu de Saint-Antoine. *Revue d'Histoire de La Pharmacie* 1947;35:159–60.
- [89] EFSA. Scientific Opinion on Ergot alkaloids in food and feed. *EFSA J* 2012;10:2798, <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2798>.
- [90] Arcella D, Gómez Ruiz JÁ, Innocenti ML, Roldán R. Human and animal dietary exposure

- to ergot alkaloids. *EFSA J* 2017;15:e04902, <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4902>.
- [91] Eich E, Pertz H. Ergot alkaloids as lead structures for differential receptor systems. *Pharmazie* 1994;49:867–77, <http://dx.doi.org/10.1002/chin.199518317>.
- [92] Fliieger M, Stodůlková E, Wyka SA, Černý J, Grobárová V, Píchová K, et al. Ergochromes: Heretofore neglected side of ergot toxicity. *Toxins* 2019;11:1–15, <http://dx.doi.org/10.3390/toxins11080439>.
- [93] Freire L, Sant'Ana AS. Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. *Food Chem Toxicol* 2018;111:189–205, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.021>.
- [94] Rychlík M, Humpf H-U, Marko D, Dänicke S, Mally A, Berthiller F, et al. Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including "masked" mycotoxins. *Mycotoxin Res* 2014;30:197–205, <http://dx.doi.org/10.1007/s12550-014-0203-5>.
- [95] Li P, Su R, Yin R, Lai D, Wang M, Liu Y, et al. Detoxification of Mycotoxins through Biotransformation. *Toxins* 2020;12:121, <http://dx.doi.org/10.3390/toxins12020121>.
- [96] Bittner A, Cramer B, Harrer H, Humpf H-U. Structure elucidation and in vitro cytotoxicity of ochratoxin α amide, a new degradation product of ochratoxin A. *Mycotoxin Res* 2015;31:83–90, <http://dx.doi.org/10.1007/s12550-014-0218-y>.
- [97] Pierron A, Mimoun S, Murate LS, Loiseau N, Lippi Y, Bracarense A-PFL, et al. Microbial biotransformation of DON: molecular basis for reduced toxicity. *Sci Rep* 2016;6:29105, <http://dx.doi.org/10.1038/srep29105>.
- [98] Lattanzio VMT, Visconti A, Haidukowski M, Pascale M. Identification and characterization of new *Fusarium* masked mycotoxins, T2 and HT2 glycosyl derivatives, in naturally contaminated wheat and oats by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2012;47:466–75, <http://dx.doi.org/10.1002/jms.2980>.
- [99] Pierron A, Mimoun S, Murate LS, Loiseau N, Lippi Y, Bracarense A-PFL, et al. Intestinal toxicity of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-beta-D-glucoside. *Arch Toxicol* 2016;90:2037–46, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-015-1592-8>.
- [100] Dall'Erta A, Cirlini M, Dall'Asta M, Del Rio D, Galaverna G, Dall'Asta C. Masked mycotoxins are efficiently hydrolyzed by human colonic microbiota releasing their aglycones. *Chem Res Toxicol* 2013;26:305–12, <http://dx.doi.org/10.1021/tx300438c>.
- [101] Gratz SW, Currie V, Richardson AJ, Duncan G, Holtrop G, Farquharson F, et al. Porcine small and large intestinal microbiota rapidly hydrolyze the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside and release deoxynivalenol in spiked batch cultures in vitro. *Applied Environ Microbiol* 2018;84:e02106–2117, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02106-17>.
- [102] McCormick SP. Microbial detoxification of mycotoxins. *J Chem Ecol* 2013;39:907–18, <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-013-0321-0>.
- [103] Gruber-Dorninger C, Novak B, Nagl V, Berthiller F. Emerging Mycotoxins: Beyond Traditionally Determined Food Contaminants. *J Agric Food Chem* 2017;65:7052–70, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03413>.
- [104] EFSA. Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. *EFSA J* 2014;12:3916, <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3916>.
- [105] Ojcius DM, Zychlinsky A, Zheng LM, Young JD. Ionophore-induced apoptosis: role of DNA fragmentation and calcium fluxes. *Exp Cell Res* 1991;197:43–9, [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827\(91\)90477-c](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(91)90477-c).
- [106] Prosperini A, Meca G, Font G, Ruiz MJ. Study of the cytotoxic activity of beauvericin and fusaproliferin and bioavailability in vitro on Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol* 2012;50:2356–61, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.030>.
- [107] Springler A, Hessenberger S, Schatzmayr G, Mayer E. Early Activation of MAPK p44/42 Is Partially Involved in DON-Induced Disruption of the Intestinal Barrier Function and Tight Junction Network. *Toxins* 2016;8:264, <http://dx.doi.org/10.3390/toxins8090264>.
- [108] Guo H, Ji J, Wang JS, Sun X. Co-contamination and interaction of fungal toxins and other environmental toxins. *Trends Food Sci Tech* 2020;103:162–78, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.021>.
- [109] Alassane-Kpembi I, Schatzmayr G, Taranu I, Marin D, Puel O, Oswald IP. Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017;57:3489–507, <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2016.1140632>.
- [110] Khoshal AK, Novak B, Martin PGP, Jenkins T, Neves M, Schatzmayr G, et al. Co-occurrence of DON and emerging mycotoxins in worldwide finished pig feed and their combined toxicity in intestinal cells. *Toxins* 2019;11:727, <http://dx.doi.org/10.3390/toxins11120727>.
- [111] Smith M-C, Madec S, Coton E, Hymery N. Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects. *Toxins* 2016;8:94, <http://dx.doi.org/10.3390/toxins8040094>.
- [112] Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A. Something from "nothing"—eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol* 2002;36:1751–6, <http://dx.doi.org/10.1021/es0101227>.
- [113] Alassane-Kpembi I, Puel O, Oswald IP. Toxicological interactions between the mycotoxins deoxynivalenol, nivalenol and their acetylated derivatives in intestinal epithelial cells. *Arch Tox* 2015;89:1337–46, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-014-1309-4>.
- [114] Alassane-Kpembi I, Puel O, Pinton P, Cossalter A-M, Chou T-C, Oswald IP. Co-exposure to low doses of the food contaminants deoxynivalenol and nivalenol has a synergistic inflammatory effect on intestinal explants. *Arch Tox* 2017;91:2677–87, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-016-1902-9>.
- [115] Smith MC, Hymery N, Troadec S, Pawtowski A, Coton E, Madec S. Hepatotoxicity of fusariotoxins, alone and in combination, towards the HepaRG human hepatocyte cell line. *Food Chem Toxicol* 2017;109:439–51, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.09.022>.
- [116] Solhaug A, Karlsøen LM, Holme JA, Kristoffersen AB, Eriksen GS. Immunomodulatory effects of individual and combined mycotoxins in the THP-1 cell line. *Toxicol in Vitro* 2016;36:120–32, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2016.07.012>.
- [117] Vejdovszky K, Hahn K, Braun D, Warth B, Marko D. Synergistic estrogenic effects of *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins in vitro. *Arch Toxicol* 2017;91:1447–60, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-016-1795-7>.
- [118] Wild CP. The exposome: from concept to utility. *Int J Epidemiol* 2012;41:24–32, <http://dx.doi.org/10.1093/ije/dyr236>.
- [119] Pérez-Ortega P, Gilbert-López B, García-Reyes JF, Ramos-Martos N, Molina-Díaz A. Generic sample treatment method for simultaneous determination of multiclass pesticides and mycotoxins in wines by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2012;1249:32–40, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.06.020>.
- [120] De Rijk TC, Van Egmond H, De Jong J. Occurrence of mycotoxins and pesticides in straw and hay used as animal feed. *RIKILT Wageningen UR* 2014. No. 2014.006 <https://edepot.wur.nl/313921>.

- [121] Eze UA, Huntriss J, Routledge MN, Gong YY. Toxicological effects of regulated mycotoxins and persistent organochloride pesticides: In vitro cytotoxic assessment of single and defined mixtures on MA-10 murine Leydig cell line. *Toxicol in Vitro* 2018;48:93–103, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.12.019>.
- [122] Lu S, Liu S, Cui J, Liu X, Zhao C, Fan L, et al. Combination of Patulin and Chlorpyrifos Synergistically Induces Hepatotoxicity via Inhibition of Catalase Activity and Generation of Reactive Oxygen Species. *J Agric Food Chem* 2019;67:11474–80, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04814>.
- [123] Le TH, Alassane-Kpembé I, Oswald IP, Pinton P. Analysis of the interactions between environmental and food contaminants, cadmium and deoxynivalenol, in different target organs. *Sci Total Environ* 2018, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.014> [622–623,841–848].
- [124] Luo S, Terziolo C, Bracarense APFL, Payros D, Pinton P, Oswald IP. In vitro and in vivo effects of a mycotoxin, deoxynivalenol, and a trace metal, cadmium, alone or in a mixture on the intestinal barrier. *Environ Int* 2019;132:105082, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2019.105082>.
- [125] Stiborová M, Bárta F, Levová K, Hodek P, Frei E, Arlt VM, et al. The influence of ochratoxin A on DNA adduct formation by the carcinogen aristolochic acid in rats. *Arch Toxicol* 2015;89:2141–58, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-014-1360-1>.
- [126] Pierron A, Alassane-kpembé I, Payros D, Pinton P, Oswald IP. Les mycotoxines "masquées": un nouveau risque en production porcine ? *Journées Recherche Porcine* 2016;48:331–40.

B. Le ribosome : un talon d'Achille pour la cellule et une cible pour les toxines naturelles

Les ribotoxines sont des composés toxiques qui ciblent spécifiquement les ribosomes pour inhiber leur fonctionnement. Cette revue s'intéresse plus particulièrement aux ribotoxines qui ciblent la grande sous-unité des ribosomes eucaryotes. En inhibant les ribosomes, les ribotoxines déclenchent non seulement l'arrêt de la traduction protéique, mais aussi un éventail de réponses cellulaires, incluant l'inflammation, le stress oxydatif, le stress du réticulum endoplasmique ou encore l'arrêt du cycle cellulaire. Cette revue a sélectionné deux inhibiteurs du ribosome eucaryote bien connus, la Shiga toxine et le DON, pour leurs modes d'inhibition du ribosome bien distincts et leurs effets sur la santé humaine. Cette étude a mis en lumière que l'inhibition du ribosome par ces deux toxines, bien qu'elle soit déclenchée de deux manières différentes, provoque des conséquences similaires au niveau cellulaire. Cette revue a permis de suggérer que ces réponses induites par les ribotoxines pourraient modifier la sensibilité des cellules à d'autres membres de l'exposome.

Cette revue a été soumise pour publication en janvier 2023.

Les tableaux 1 à 6 sont présentés en annexe I de ce manuscrit.

Ribosome : an Achilles' heel for the cell and a target for natural toxins

Marion Garofalo^{a,b}, Delphine Payros^{a,b}, Frederic Taieb^b, Eric Oswald^{b,c}, Jean-Philippe Nougayrède^{b*}, Isabelle P. Oswald^{a*}.

^aToxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

^bIRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRAE, ENVT, UPS, Toulouse, France

^cCHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service de Bactériologie-Hygiène, Toulouse, France

*Corresponding authors : isabelle.oswald@inrae.fr ; jean-philippe.nougayrede@inrae.fr

Keywords : ribosomes ; ribotoxins ; stress responses ; deoxynivalenol ; Shiga toxin.

ABSTRACT

Ribosomes are highly evolutionarily conserved organelles that synthesize proteins, which are fundamental components of life. Many pathogens have developed toxins to inhibit the ribosomal function. These toxins, called ribotoxins, can be separated into two broad groups according to their mode of action at the ribosome level. The first group includes toxins that cleave ribosomal RNA, and the second group includes toxins without enzymatic activity, which bind to the peptidyl transferase center. This review illustrates these two major groups of ribotoxins that target the eukaryotic ribosome with two main representatives : the bacterial toxin Shiga toxin, and the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. Acting differently, these ribotoxins trigger nevertheless very similar cellular responses. Indeed, ribotoxins induce multiple consequences at the cellular level, including the activation of the “ribotoxic stress response”, but also endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, cell cycle arrest and autophagy.

I. Ribosomes are the Achilles' heels of the cells

Proteins are essential to cell life, as they are responsible for transport, defense, metabolism, cell shape and organization, biochemical reactions, signal transduction and cellular responses.

In all living organisms, ribosomes are large ribonucleoprotein assemblies responsible for the synthesis of protein and more specifically the conversion of the genetic information encoded within mRNA into the corresponding protein. In each cell, up to 10 million ribosomes join up about 200 amino acids per minute (Steitz 2008). Ribosomes, whether prokaryotic (70S) or eukaryotic (80S), have similar structures. This universal common core (≈ 2 million Daltons) has hardly evolved since LUCA, the Last Universal Common Ancestor (Bowman *et al.* 2020). Indeed, evolution has carefully preserved the structure and function of the ribosome throughout the tree of life. In the universal gene set of life, which include about 65 genes shared by all domains of life, 53 are involved in ribosomal function (Koonin 2003). Thus, the most accurate trees of life are constructed on the basis of the sequences of components of the translation machinery (Ciccarelli *et al.* 2006). Ribosomes consist of two subunits, a large one and a small one. In eukaryotes, the large subunit (60S) is composed of 5S, 28S, and 5.8S rRNA and of 49 ribosomal proteins. The small subunit (40S) is composed of a single 18S rRNA and of 33 ribosomal proteins. These two subunits catalyze the three phases of protein translation : initiation, elongation, and termination (Steitz 2008). The initiation step corresponds to the recruitment of the first transfer RNA (tRNA)-aminoacyl complex on the first codon. Elongation, or synthesis of the nascent peptide, occurs in the three binding sites of tRNA (A, P, and E) of the large subunit. Elongation is composed of three steps : the binding of the following tRNA-aminoacyl complex to the A site, the peptide bound formation (peptidyl transferase activity) in the A and P sites, and the translocation (slippage of deacetylated tRNA to the E site). The termination occurs when the ribosome encounters a STOP codon and leads to the dissociation of the mRNA-ribosome complex. The two functional cores of the ribosome, the decoding center (site of codon recognition) and the peptidyl transferase center (PTC), which is the site of the peptide bound formation, are among the most highly conserved sites through evolution (Bowman *et al.* 2020). The GTPase center, a region at which elongation factors hydrolyze GTP molecules to generate energy required for the different steps of peptides elongation, has also been highly conserved (Laskin 2002).

Ribosomes synthesizes proteins which are essential for all the cellular functions, they can be considered as “Achilles heel of the cell”. Consequently, prokaryotic and eukaryotic pathogens, have developed ingenious strategies to inhibit their function. Among the weapons developed by pathogens to weaken their targets (DNA, membrane, or cytoskeleton synthesis inhibitors...), ribotoxins, and in particular those targeting the eukaryotic large ribosomal subunit are among the most conserved (Finlay and Falkow 1997).

To inhibit the ribosomal function, prokaryotes and eukaryotes express toxins that inhibit protein translation using various strategies. Through two examples, the bacterial toxin Shiga toxin, and the mycotoxin deoxynivalenol, this review illustrates that even if acting differently, these ribotoxins trigger similar cellular responses and highlights that the consequences of ribosome intoxication are independent of the type of ribosomal damage.

II. Two main modes of action of ribotoxins

Among the wide variety of toxins targeting the large 60S ribosomal subunit, two major modes of action can be distinguished, and two families of toxins defined. The first family exhibits rRNA-cleaving enzymatic activity, while the second family interferes with the ribosome by steric hindrance.

A. Enzymatic rRNA cleavage : the example of Shiga toxin

The first group of ribotoxins induces rRNA cleavage through an enzymatic activity. It is exemplified by the Shiga toxins (Stx), a family of bacterial toxins mainly produced by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). EHEC are pathogenic bacteria which mainly originate from bovine reservoir. These bacteria can contaminate humans through food, especially undercooked meat and raw milk products. In 2019, in Europe, EHEC infections were the third most reported zoonosis in humans with 2.1 cases per 100,000 inhabitants (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control 2021). The ribotoxin Stx, also called "verotoxin" for its ability to kill Vero cells, is the main virulence factor of EHEC.

Stx is a member of the large family of ribosome inactivating proteins (RIPs), which includes several toxins from various sources that enzymatically cleave the 28S rRNA in the 60S subunit. RIPs include plant toxins such as the highly toxic ricin toxin, but also fungal toxins such as α -sarcin, and other bacterial toxins such as Burkholderia Lethal Factor 1 (For review, see Walsh *et al.* 2013). The Stx family includes Shiga toxins type 1 (Stx1) and type 2 (Stx2), which are further classified into subtypes (Stx 1a to 1d ; Stx 2a to 2h) (Melton-Celsa 2014). Regardless of the subtype, Stx are AB₅ toxins, formed of by the enzymatically active (A) subunit and five B subunits involved in host cell the host cell binding (Melton-Celsa 2014). Stx binds to its cellular receptors globotriaosylceramide (Gb3) or globotetraosylceramide (Gb4), which are mainly expressed by endothelial cells.

After its binding, the toxin is internalized by endocytosis and travels to the cytoplasm by retrograde trafficking, which involves passage through the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum (Sandvig *et al.* 2010).

The active subunit of Stx targets the 28S rRNA of the large ribosomal subunit and exerts its toxicity through its N-glycosidase activity. The A subunit of Stx toxin cleaves the bond between a specific adenine residue and a sugar in the sarcin-ricin loop (SRL), a specific zone of the GTPase center (Tumer and Li 2011) (Figure 1). The SRL is a highly conserved region in the 28S rRNA of the large ribosomal subunit, which is crucial for the binding of elongation factors to the ribosome (Shi *et al.*, 2012), which are required for the elongation process (Xu *et al.* 2022). Cleavage of the SRL by Stx prevents binding of elongation factors, resulting in protein translation arrest (Tumer and Li 2011). To gain access to the SRL and cleave the rRNA, Stx interacts with ribosomal proteins, and in particular with those that build the p-stalk, an essential domain of the ribosome that serves as a platform for translational GTPases. It has been demonstrated that Stx hijacks the function of p-stalk to use it as a platform to access the SRL (Rudolph *et al.* 2020) (Figure 1).

Exposure to Stx has multiple consequences at the macroscopic level, in humans as in animals. Indeed, Stx is produced in the intestine, translocated into the circulatory system, and distributed to tissues which express its receptor. As the main target of Stx are of the kidney, brain, and colon endothelial cells, its effects are the consequences of a global endothelial destruction. Stx-induced damage the blood vessels endothelium causes hemorrhages, and damage to the kidney endothelial cells leads to renal dysfunction. In swine, Stx-induced endothelial damage results in edema disease (Casanova *et al.* 2018). Edema disease also triggers neurological symptoms that are a consequence of the toxin's destruction of the endothelial blood-brain barrier. In humans, EHEC infections mostly induce diarrheal diseases, and can progress to hemolytic uremic syndrome (HUS) in 5 to 10% of cases. HUS is a serious condition which mainly occurs in children, characterized by symptoms resulting from Stx-induced endothelial cells destruction, including thrombocytopenia, edema, anemia, bloody diarrhea, renal failure, and death (Karpman *et al.* 2017). Interestingly, poisoning with other RIPs can evoke symptoms encountered in the SHU. For example, depending on the dose and the route of exposure, ricin intoxication can induce hemorrhage and kidney failure (Audi *et al.*, 2005).

B. Steric hindrance : the example of the trichothecene deoxynivalenol

The second group of ribotoxins includes toxins which do not exhibit enzymatic activity, but induce steric hindrance, which results in blocking the PTC of the ribosome. This family is illustrated by trichothecenes (TCT) such as deoxynivalenol (DON). These ribotoxins are a highly prevalent class of mycotoxins. Mycotoxins are secondary metabolites produced by microscopic fungi, which contaminate up to 70% of the world crops production (Payros *et al.* 2021 ; Eskola *et al.* 2020). TCT form a large family of over 200 mycotoxins with a common sesquiterpenoid structure. TCT are classified in four groups. TCT-A and TCT-B, produced by fungi of the genus *Fusarium* which colonize cereals, are the most common groups of TCT. DON contaminates up to 50% of European cereals and is the most common and the most studied TCT (Knutsen *et al.* 2017). DON targets the intestinal and immune cells, in which it binds non-covalently to the large subunit of the ribosome, in the PTC (Figure 1). DON fits in the A site of the ribosome, interacts with a magnesium atom, and forms 3 hydrogen bonds with rRNA nucleotides : one with an uracil, the second with a guanine, and the third with another uracil (Pierron *et al.* 2016 ; Dellafiora *et al.* 2017).

Fusarium species also produce DON derivatives compounds such as 3-Acetyl-DON and 15-Acetyl DON. Unlike DON, 3-Acetyl-DON and 15-Acetyl DON only forms 2 hydrogen bonds with the ribosome. DON can be detoxified either by plants to DON-3-glucoside (D3G), or by bacteria to de-epoxy-DON (DOM-1), 3-epi-DON, and 3-keto-DON. These forms do bind much less efficiently to the ribosome, leading to reduced toxicity. For example, a structural computational study show that D3G exhibits voluminous substitutions that interfere with the binding of the molecule to the ribosomal binding pocket (Dellafiora *et al.* 2017). In the DOM-1 molecule, a hydrophobic group replace the epoxy ring of the DON molecule. As a result, DOM-1 can't interact with the hydrophilic environment of the binding site, reducing the affinity with the ribosome (Dellafiora *et al.* 2017). In contrast, other TCT such as T-2 toxin (T-2) and diacetoxysispreol (DAS) exhibits a largely greater toxicity compared to DON (Rocha *et al.* 2005 ; Garofalo *et al.* 2023). This could be explained by the presence of substitutions in C₄, C₇, C₈, C₁₅ or C₁₆, which are absent of the DON molecule. These substitutions extend the non-polar contact surface with the ribosome (Wang *et al.* 2021).

The precise mechanisms by which DON and TCT arrest translation are not totally understood.

However, as the reaction of peptide bond formation requires the proper alignment of the aminoacyl-tRNA and the peptidyl-tRNA (Rodnina and Wintermeyer 2003), binding of TCT, which induce structural rearrangements, is susceptible to disturb this alignment and thus prevent the peptide bond formation (Garreau de Loubresse *et al.* 2014). Other alternative mechanisms have been proposed to explain the protein synthesis inhibition induced by DON. For example, He and Pestka proposed that DON increase the expression of microRNA, which interferes with the production of ribosomal proteins. According to authors, this down regulation of ribosomal proteins could interfere with protein translation (He and Pestka, 2010). The same group also suggest that DON and T-2 promote the cleavage of ribosomal RNA, possibly by promoting the action of endogenous RNase (Li and Pestka 2008).

Depending on the dose and duration of exposure, chronic or acute contamination with DON and other TCT have important repercussions in humans as well as in animals. Indeed, it induces emesis and anorexia, diarrhea, but also growth defects, altered immune responses, and alteration of intestinal functions (Payros *et al.* 2016 ; Kamle *et al.* 2022). These macroscopic large-scale effects are the consequence of DON diffusion through the blood stream and distribution to the wall organism. At the intestinal level, it decreases the number and size of intestinal villi, leading to defect in barrier functions and absorption which trigger diarrhea (Pinton *et al.* 2009). Emesis can be the consequence of a direct action on the brain (dysregulation of anorectic factors production) or of an indirect action on the gut (dysregulation of hormonal functions) (Terciolo *et al.*, 2018). Inflammatory responses are the consequence of DON targeting of immune cells and intestinal cells, and mainly results from stress responses activation (see chapter III.B.)

III. Consequences of targeting the ribosome

The most obvious consequence of ribotoxins intoxication is the arrest of protein translation. For Stx, which cleave the SRL, the translation inhibition occurs during elongation, and more precisely at the binding of the aminoacyl-tRNA to the ribosome step. Indeed, this step is dependent on the elongation factor eEF1, whose recruitment is inhibited by the toxin (Brown *et al.* 1986). For ribotoxins which induce steric hindrance, this inhibition can occur at different stages of translation. For example, T-2 toxin has been classified as a I type ribosomal inhibitor, since it preferentially inhibits translation initiation (recruitment of the first tRNA-aminoacyl complex). By contrast DON belongs to the ET type, since it inhibits elongation and termination steps (Cundliffe and Davies 1977).

Ribotoxins inhibit protein translation, but more importantly activate several stress response pathways such as ribotoxic stress response, endoplasmic reticulum stress, autophagy.... These above-mentioned pathways can also lead to the arrest of protein translation. Thus, it is challenging to clearly separate the effects of translation inhibition from those triggered by each of the stress responses (Figure 1).

A. The ribotoxic stress response

As ribosomes are the Achilles' heel of the cell, their function is carefully monitored by numerous pathways, such as the Ribosome associated Quality Control and the Integrated Stress Response (For review, see Vind *et al.*, 2020). The Ribotoxic Stress response (RSR) is one of the major and best described ribosomal surveillance pathways initiated in response to ribosomal insults. The term RSR, proposed by Iordanov in 1997, is defined as “a cellular reaction to cytotoxic interference with the function of the 3'-end of the large (28S/23S) ribosomal RNA” (Iordanov *et al.* 1997). Generally, ribotoxins that does not interact with the the large ribosomal subunit does not activate the RSR. As an example, by targeting the small ribosomal subunit, pactamycin, a ribosome inhibitor which prevent the interaction of the tRNA with the corresponding codon (Brodersen *et al.*, 2000), is a very weak inducer of RSR (Iordanov *et al.* 1997). In mammalian cells, the RSR stimulates the signaling of MAP kinases (MAPKs).

1. The RSR triggers MAPK activation

Three families of MAPKs have been identified as playing a role in the RSR : (Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK), c-Jun N-terminal kinases (JNK), and p38. MAPKs are themselves regulated by other MAP Kinases Kinases (MAP2Ks), inducing successive phosphorylation cascades. MAP3Ks, the kinases upstream of the cascade, phosphorylate MAP2Ks, which in turn phosphorylate MAPKs (Braicu *et al.* 2019). MAPKs activation is largely demonstrated, for DON as well as for Stx. Indeed, DON and Stx activates p38, JNK and ERK kinases in a dose dependent manner *in vitro* as well as *in vivo* (Foster and Tesh 2002 ; Cameron *et al.* 2003 ; Cherla *et al.* 2009). For both ribotoxins, ribosomal damage is directly responsible for MAPK induction, as non ribotoxic forms of DON and Stx does not activate MAPK. For example, DON, but not DOM-1, induce the phosphorylation of p38 and JNK in Caco-2 cells (Pierron *et al.*, 2016a). Similarly, Stx, but not the mutant toxin, activates p38 and JNK in HCT-8 cells (Smith *et al.*, 2003). DON and Stx also activate MAPK *in vivo*.

Indeed, the active form of Stx activates p38 in the colon of infant rabbits orally intoxicated with purified Stx2 (Stone *et al.*, 2012). Similarly, DON activates p38, ERK and JNK pathways in the intestine of pigs fed with a contaminated diet (Lucioli *et al.* 2013 ; Pinton *et al.*, 2012). The kinetic of MAPK phosphorylation differs between the two toxins. Indeed, unlike DON, which diffuse through cells membrane, Stx must use the retrograde trafficking to join the ribosome. Thus, Stx join the ribosome latter than DON and consequently activate MAPK later than DON. As a result, Stx-induced activation of the p38 MAPK does not occur before 60 mn incubation (Smith *et al.*, 2003), whereas DON activates p38 in only 5 minutes (Zhou *et al.*, 2005).

The precise ways by which DON and Stx activate the RSR are not completely understood. One hypothesis is the activation of the MAP3K ZAK (Sterile Alpha motif and leucine Zipper), or MAP3K20, which is thought to probe structural changes in the polysome such as ribosome collisions (Vind *et al.* 2020). It has been suggested that ZAK is implicated in the ribosomal stress transduction induced by DON and similar ribosome inhibitors (Wu *et al.* 2020 ; Robinson *et al.* 2022). In the same manner, the ZAK kinase has been proposed as a transducer of the Stx and ricin induced RSR (Jandhyala *et al.* 2008). In this sense, the ZAK inhibitor imatinib inhibits the Stx2-induced JNK activation in infant rabbits treated with Stx (Stone *et al.*, 2012). This kinase would function as a sentinel, capable of monitoring some ribosomal collisions by autophosphorylation, and of transmitting the signal to the MAP2Ks downstream of the chain. Other kinases such as the double-stranded RNA-dependent Protein Kinase (PKR) has been proposed as sensors of ribosomal damage. Indeed, Zhou *et al.* proposed that the two PKR monomers has a strategic position on the ribosome surface. In this model, DON-induced structural rearrangements induce the dimerization of the monomers, leading to PKR activation (Zhou *et al.* 2014). Hematopoietic Cell Kinase (HCK), and the PKN kinase, could also be implicated in the detection of changes in the rRNA structure, leading to p38 and ERK activation (Takahashi 2003 ; Bae *et al.* 2010). Calcium has been proposed has an alternative upstream regulator of MAPK activation. Indeed, a study suggests that Stx induce an increase of intracellular calcium concentration in Vero cells, which is directly responsible for p38 phosphorylation (Ikeda *et al.* 2000).

MAPKs are implicated in multiple cellular pathways, depending on the MAPK family, but also of the nature and duration of exposure to the stimulus. In the case of ribotoxins, MAPKs are mainly involved in inflammatory responses and apoptosis induction. In general, MAPKs-driven inflammatory responses occur in response to low doses and/or low exposure times, whereas apoptosis occurs at higher doses and/or higher exposure time (Tables 1 and 2).

Indeed, a transient activation of MAPK triggers cell survival pathways, whereas a prolonged activation of MAPK is associated with apoptosis (Cherla *et al.* 2009 ; Pestka 2010).

2. The RSR triggers inflammation

Inflammation, marked by cytokines production by immune and non-immune cells and aims to protect the organism against aggressors, is the first major consequence of the RSR activation. Numerous studies describe DON and Stx as potent pro-inflammatory compounds, both *in vitro* and *in vivo* (Table 1). The link between MAPK activation and inflammation is not surprising, as activated MAPKs are well-known as key regulators of inflammatory mediators, such as interleukins, tumor necrosis factor- α (TNF- α) or cyclooxygenase-2 (COX-2) (Kaminska 2005 ; Moens *et al.* 2013). The effects of DON and Stx on inflammation are driven by the activation of different families of MAPKs, depending on doses of the toxin, cell line, incubation time, and inflammation mediator (Cherla *et al.* 2009 ; Pestka 2010 ; Pinton *et al.* 2010 ; Pinton and Oswald 2014 ; García *et al.* 2018). As a result, MAPKs inhibitors abolish the DON and Stx-induced cytokines production. For example, in HeLa cells, an inhibitor of MK2, a MAPK in downstream of p38, decreased the inflammatory response to Stx (Saenz *et al.* 2010). Similarly, in porcine intestinal epithelial cells, MAPKs inhibitors decrease the levels of DON-induced IL6 and several inflammation-related proteins (Zhang *et al.* 2020). In response to ribotoxins, MAPKs upregulate proinflammatory cytokines both at the transcriptional and post-transcriptional levels. Indeed, J. Pestka's group demonstrated that two MAPKs, p38 and ERK, upregulate the transcription of mRNAs encoding TNF- α and COX-2 in response to DON. However, the same group has shown that only the p38 MAPK can act at the post-transcriptional level, by promoting the stability of TNF- α and COX-2 mRNAs (Chung *et al.*, 2003, Moon *et al.*, 2003). Similarly, Stx superinduce and stabilizes multiple inflammatory cytokines mRNA through the RSR, notably IL-8 and C-X-X chemokines (Thorpe *et al.*, 2001 ; Smith *et al.*, 2003).

Inflammatory response has numerous repercussions on the hosts cells. For example, DON-induced inflammation can promote allergic response (Bol-Schoenmakers *et al.* 2016), inflammatory bowel disease (Payros *et al.* 2020, 2021), and loss of barrier functions (Pinton *et al.* 2012). For Stx, inflammation promotes epithelial leakage, and thus favor the translocation of the toxin into the bloodstream (Exeni *et al.* 2018). Stx-induced inflammation also promote pyroptosis, an inflammatory form of programmed cell death (Platnich *et al.* 2018) (Table 2).

3. The RSR triggers cell death and apoptosis

As mentioned above, prolonged MAPK activation can result in apoptosis. For DON, numerous studies demonstrated the role of MAPK in cell death with the use of *in vitro* as well *in vivo* models. In the table 2, the most important review in the field reports the role of this toxin on cell death.

The 3 families of MAPK induce multiple effects ranging from survival to cell death or inflammation. However, the ERK pathways appears to be more associated with cell death and survival, and induction of apoptosis more specifically driven by p38 and JNK (Bae and Pestka 2008). Inhibitors of p38 inhibited cell death induced by Stx, in contrast to inhibitors of ERK 1/2 (Ikeda *et al.* 2000). For both DON and Stx, p38 inhibition blocks the activation of caspase 3 induced by each of these ribotoxins (Zhou *et al.* 2005 ; Smith *et al.* 2003).

Induction of apoptosis through MAPK can be explained by their capacity to increase the expression of pro-apoptotic factors. Indeed, MAPK increase the expression of transcription factors such as p53 or AP-1, resulting in pro-apoptotic proteins production (Whitmarsh and Davis 1996 ; Wu 2004). Both JNK and p38 MAPK also regulate the intrinsic apoptotic pathway, with release of Bcl2-associated X proteins (Bax) and translocation to the mitochondria (Yue and López 2020). DON and Stx-induced cell death can trigger intestinal villi destruction, intestinal lesions (Pinton *et al.* 2010, 2015 ; Schüller 2011), or immune suppression (Pestka 2008 ; Payros *et al.* 2020). For Stx, damage to endothelial cells induce renal tubular injury and renal failure, vascular edema, vessel lumen narrowing, and dysfunction of coagulation functions (Obrig and Karpman 2011 ; Bailey *et al.* 2019 ; Lee and Tesh 2019).

B. RSR-independent consequences of ribosome inhibition

Stx and DON also trigger other toxic effects for which the involvement of MAPKs is not demonstrated, including oxidative stress, cell cycle arrest, endoplasmic reticulum (ER) stress, and autophagy. Although this review presents the effects of ribotoxins by separating those due to the RSR and those that are not, there is a thin line between these two types of effects. Indeed, it should be kept in mind that these two broad categories of consequences could influence each other. For example, inflammation can trigger oxidative stress and, conversely, oxidative stress can activate certain MAPKs (Ikeda *et al.*, 2000). Similarly, a role of ER stress in IL-6 induction by DON has been suggested (Shi *et al.*, 2009). Therefore, although the effects of the ribotoxins described below have not, to date, been linked to MAPKs, the existence of a potential links with the RSR cannot be totally excluded (Figure 1).

1. Oxidative stress

Ribotoxins induce oxidative stress, which occurs when the concentration of reactive oxygen species (ROS) is higher than the antioxidant capacity (Pizzino *et al.* 2017). *In vitro* and *in vivo*, DON and Stx increase the production of mitochondrial ROS and malondialdehyde and reduce the glutathione content (Bodea *et al.* 2009 ; Platnich *et al.* 2018 ; Gomez *et al.* 2013). The mechanisms explaining the imbalance between ROS concentration and antioxidant capacities observed after DON and Stx exposure are not well understood. One can suggest that this is the direct consequence of protein translation arrest, which prevent the production of antioxidant peptides such as glutathione. Oxidative stress could also be the consequence of inflammatory responses, as ROS are key mediators of inflammation (Mittal *et al.* 2014) (Table 3). Lebrun 2015 proposes that the oxidative stress caused by TCT is not a consequence of ribosome inhibition but is due to mitochondrial stress (Lebrun 2015). Is the inhibition of mitochondrial translation the consequence of ribosome inhibition? As MAPK activation can disrupt the mitochondrial function (Yue and López 2020), one can imagine the RSR as the origin of mitochondrial dysfunction. Conversely, Bin-Umer *et al.* 2011 proposes that the TCT-induced mitochondrial translation inhibition occurs through a mechanism independent of the ribosomal inhibition (Bin-Umer *et al.* 2011). Ribotoxins-induced oxidative stress can leads to diverse toxic effects, such as damaging of cells membrane, proteins, and DNA, and can also lead to caspase-mediated apoptosis, as demonstrated for T-2 toxin (Chaudhari *et al.* 2009).

2. Cell cycle arrest

Both DON and Stx are able of arresting the cell cycle. Ribotoxins can therefore be considered as “cyclomodulins”, a term proposed for Stx and other bacterial effectors that alter the cell cycle (El-Aouar Filho *et al.* 2017). DON and other TCT, as well as Stx, induce of cell cycle arrest whether in S, G0/G1, or G2/M phases, depending on the toxin, cell line and the concentration of exposure (Bhattacharjee *et al.* 2005 ; Yang *et al.* 2008 ; Deng *et al.* 2016 ; Lei *et al.* 2017) (Table 4). Cell cycle arrest prevents the propagation of dysfunctional cells and promote the repair of damaged cellular functions. However, a prolonged cell cycle arrest, due to persistent damage, leads to cell death and tissue destruction, disruption of primordial cellular functions, and deregulations of genes expression (Vermeulen *et al.* 2003). The exact causes of Stx and DON-induced cell cycle arrest are not well described, but several mechanisms have been proposed. For Stx, cell cycle arrest could be the consequence of irreversible DNA damage (Bhattacharjee *et al.* 2005).

Indeed, it has been proposed that Stx could remove an adenine in nuclear DNA, in the same way as in rRNA (Brigotti *et al.* 2002). For DON, it has been suggested that cell cycle arrest is due to the stabilization of the p21 mRNA, whose over-expression triggers cycle arrest. Interestingly, this study also suggests a role for ERK1/2 MAPKs in stabilizing p21 mRNA (Yang *et al.*, 2008). The RSR could therefore be involved in cycle arrest. This is conceivable, as in response to ribotoxic stress, activated MAPK can target multiple substrates implicated in cell cycle control, including p21 but also p53, p27, AP1, or E2F1 (Wilkinson and Millar 2000). Further studies are needed to decipher the precise signaling pathways involved in the induction of cycle arrest by ribotoxins.

3. Endoplasmic reticulum stress

ER stress include pathways induced in response to an accumulation of unfolded or misfolded proteins. ER stress is notably signed by the activation of three membrane-associated sensors of protein folding PERK, ATF6, and IRE-1 (Hetz 2012), and by the degradation of the ER stress chaperone Glucose Regulated Protein 78 (GRP78). DON and Stx are both described to induce ER stress *in vitro* (Table 5). For example, Stx induce ER stress markers in human macrophages after 2h exposure (Lee *et al.*, 2008). In the same manner, in murine macrophages, DON trigger the degradation of GRP78 after 1h of exposure (Shi *et al.*, 2009). For Stx, ER stress could be activated during the retrograde transport, which imply the passage of Stx through the ER. In this sense, a study suggest that the Gb3-dependant endocytosis is directly implicated in Stx-induced ER stress (Park *et al.*, 2017). One can speculate that Stx transiently unfold during the transport, generating the recruitment of the ER stress pathway which sense unfolded proteins. ER sensors could also be activated by the accumulation of truncated peptides, a consequence of the arrest of protein synthesis (Lee *et al.* 2010). As protein synthesis inhibition is the consequence of all ribosome inhibitors intoxication, this theory could be proposed for DON and other ribosome inhibitors. However, the underlying mechanisms of ER stress induction by DON are not elucidated. Although ER stress aims to restore protein folding, if prolonged, ER stress can lead to apoptosis, through activation of pro-apoptotic factors (Bhattarai *et al.* 2020).

4. Autophagy

Autophagy is a complex process that degrades aged or damaged intracellular proteins, components, or intracellular pathogens by isolating them into autophagosomes that fuse with lysosomes, resulting in their degradation (Dikic and Elazar 2018). Both DON and Stx induce imbalances in autophagic flux, mainly evidenced by LC3-I to LC3-II cleavage, a marker of autophagosome formation (Tang *et al.* 2015b, a ; Liu *et al.* 2022 ; Beisl *et al.* 2022) (Table 6). Autophagy is usually triggered later than other stress response pathways. Indeed, DON (Liu *et al.*, 2022) and Stx (Tang *et al.*, 2015) promote the LC3-I cleavage only after a 24h treatment, in porcine intestinal epithelial and Caco-2 cells, respectively. Autophagosomes accumulation is a physiological response to remove truncated and misfolded peptides resulting from translation arrest. Although autophagy is an essential physiological process, it is a “double-edged sword”. Indeed, if maintained at high levels, it promotes cell death by apoptosis, as it leads to the degradation of components essential for cell survival (Levine and Kroemer 2008). In this sense, Stx-induced apoptosis has been associated with disruption of autophagic flux (Tang B. *et al.*, 2015).

IV. Conclusion

To conclude, ribosomes inhibitors are highly evolutionarily conserved virulence factors, which exhibit various modes of actions. This review show that these molecules have multiple cross-cutting effects on mammalian cells, which does not depend on the type of ribotoxin. Indeed, ribotoxins which cleaves the rRNA such as Stx induce comparable effects with ribotoxins without enzymatic activity such as DON.

Why do pathogens target ribosomes? One obvious answer to this question, is that the ribosome can be considered as the "Achilles' heel" of the cell, as it is the hub of all cellular functions. Inhibiting its function blocks protein synthesis, preventing, among other things, ATP synthesis, mitochondrial function, membrane protein synthesis, synthesis of antioxidants, DNA repair... and this with only one toxin. The production of a toxin with such pleiotropic effects is very advantageous from the point of view of energy cost for the pathogen or competing organism. For example, ribosome inhibitors can be useful for taking advantage of the environment, or for competing with bacteria, viruses, fungi or parasites. For example, a ribotoxin from a plant protects the producer plant against the Tobacco Mosaic Virus (Dallal and Irvin 1978), and a ribotoxin from apple inhibit the aphid's development to protect the fruit (Hamshou *et al.* 2017).

Similarly, DON weakens plant defense, thus favoring colonization of wheat by *F. graminearum* (Audenaert *et al.* 2013), and amoebae has been proposed as a target of Stx (Koudelka *et al.* 2018).

Humans are probably only accidental hosts for pathogens (Williams and Clarke 1998) and especially those producing these toxins, but ribotoxins are full-fledged members of the human "exposome". Given the omnipresence of ribotoxins and their toxicity even at low doses, ribotoxins should be considered in the same way as other contaminants. In addition, ribotoxins should be of particular interest as they may increase the effect of other members of the exposome. As an example, several ribotoxins such as DON and TCT exacerbate the DNA damage induced by several genotoxins (Payros *et al.* 2017 ; Garofalo *et al.* 2023). Depending on the dose and duration of exposure, DON and the heavy metal Cadmium show additive effects on apoptosis induction, and the role of MAPK and oxidative stress has been proposed in this interaction (Guo *et al.* 2021). Another example is homoharringtonine (HHT), a ribotoxin from a plant which is used in cancer therapy (Gilles *et al.* 2020). HHT promote the cytotoxicity and apoptosis induced by the topoisomerase inhibitor etoposide. Oxidative stress has been proposed to play a role in this synergistic effect (Zhang *et al.* 2019).

To conclude, the ribosome is a highly conserved target for pathogens. Through the example of two different ribotoxins, this review highlights that the mode of action of the ribosome inhibitor does not determine the consequences for the targeted cell. As humans are exposed to diverse ribotoxins, which are effective at very low doses, they have to be considered in the context of the exposome, as they can synergize the effects of multiple drugs.

REFERENCES

- Agostini-Dreyer A, Jetzt AE, Skorupa J, *et al.* (2019) IGFBP-3 Induced by Ribotoxic Stress Traffics From the Endoplasmic Reticulum to the Nucleus in Mammary Epithelial Cells. *Journal of the Endocrine Society* 3 :517–536. doi : 10.1210/js.2018-00330.
- Alassane-Kpembé I, Pinton P, Hup J-F, *et al.* (2018) *Saccharomyces cerevisiae boulardii* Reduces the Deoxynivalenol-Induced Alteration of the Intestinal Transcriptome. *Toxins (Basel)* 10 :199. doi : 10.3390/toxins10050199 19.
- Audenaert K, Vanheule A, Höfte M, Haesaert G (2013) Deoxynivalenol : A Major Player in the Multifaceted Response of *Fusarium* to Its Environment. *Toxins* 6 :1–19. doi : 10.3390/toxins6010001.
- Bae H, Gray JS, Li M, *et al.* (2010) Hematopoietic Cell Kinase Associates with the 40S Ribosomal Subunit and Mediates the Ribotoxic Stress Response to Deoxynivalenol in Mononuclear Phagocytes. *Toxicological Sciences* 115 :444–452. doi : 10.1093/toxsci/kfq055.

- Bae HK, Pestka JJ (2008) Deoxynivalenol Induces p38 Interaction with the Ribosome in Monocytes and Macrophages. *Toxicological Sciences* 105 :59–66. doi : 10.1093/toxsci/kfn102.
- Bailey, Breton, Panic, *et al.* (2019) The Mycotoxin Deoxynivalenol Significantly Alters the Function and Metabolism of Bovine Kidney Epithelial Cells *In Vitro*. *Toxins* 11 :554. doi : 10.3390/toxins11100554.
- Beisl J, Pahlke G, Ehling-Schulz M, *et al.* (2022) Cereulide and Deoxynivalenol Increase LC3 Protein Levels in HepG2 Liver Cells. *Toxins* 14 :151. doi : 10.3390/toxins14020151
- Bhattacharjee RN, Park K-S, Uematsu S, *et al.* (2005) *Escherichia coli* verotoxin 1 mediates apoptosis in human HCT116 colon cancer cells by inducing overexpression of the GADD family of genes and S phase arrest. *FEBS Letters* 579 :6604–6610. doi : 10.1016/j.febslet.2005.10.053.
- Bhattarai KR, Chaudhary M, Kim H-R, Chae H-J (2020) Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Response Failure in Diseases. *Trends in Cell Biology* 30 :672–675. doi : 10.1016/j.tcb.2020.05.004.
- Bianco G, Fontanella B, Severino L, *et al.* (2012) Nivalenol and Deoxynivalenol Affect Rat Intestinal Epithelial Cells : A Concentration Related Study. *PLoS One* 7 :. doi : 10.1371/journal.pone.0052051.
- Bin-Umer MA, McLaughlin JE, Basu D, *et al.* (2011) Trichothecene Mycotoxins Inhibit Mitochondrial Translation—Implication for the Mechanism of Toxicity. *Toxins* 3 :1484–1501. doi : 10.3390/toxins3121484.
- Bodea GOD, Munteanu MC, Dinu D, *et al.* (2009) Influence of deoxynivalenol on the oxidative status of HepG2 cells. *Rom Biotechnol Lett* 14 :11.
- Bol-Schoenmakers M, Braber S, Akbari P, *et al.* (2016) The mycotoxin deoxynivalenol facilitates allergic sensitization to whey in mice. *Mucosal Immunol* 9 :1477–1486. doi : 10.1038/mi.2016.13.
- Bowman JC, Petrov AS, Frenkel-Pinter M, *et al.* (2020) Root of the Tree : The Significance, Evolution, and Origins of the Ribosome. *Chem Rev* 120 :4848–4878. doi : 10.1021/acs.chemrev.9b00742.
- Braicu, Buse, Busuioc, *et al.* (2019) A Comprehensive Review on MAPK : A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers* 11 :1618. doi : 10.3390/cancers11101618.
- Brigotti M, Alfieri R, Sestili P, *et al.* (2002) Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin in human endothelial cells. *FASEB j* 16 :365–372. doi : 10.1096/fj.01-0521com.
- Brown JE, Obrig TG, Ussery MA, Moran TP (1986) Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* 1 inhibits protein synthesis in reticulocyte lysates by inactivation of aminoacyl-tRNA binding. *Microbial pathogenesis* 1 :325–334.

- Cameron P, Bingham D, Paul A, *et al.* (2002) Essential Role for Verotoxin in Sustained Stress-Activated Protein Kinase and Nuclear Factor Kappa B Signaling, Stimulated by *Escherichia coli* O157 :H7 in Vero Cells. *Infect Immun* 70 :5370–5380. doi : 10.1128/IAI.70.10.5370-5380.2002.
- Cameron P, Smith SJ, Giembycz MA, *et al.* (2003) Verotoxin activates mitogen-activated protein kinase in human peripheral blood monocytes : role in apoptosis and proinflammatory cytokine release : Role of VT-induced MAPK in human monocytes. *British Journal of Pharmacology* 140 :1320–1330. doi : 10.1038/sj.bjp.0705560.
- Casanova NA, Redondo LM, Dailoff GC, *et al.* (2018) Overview of the role of Shiga toxins in porcine edema disease pathogenesis. *Toxicon* 148 :149–154. doi : 10.1016/j.toxicon.2018.04.019.
- Chaudhari M, Jayaraj R, Bhaskar ASB, Lakshmana Rao PV (2009) Oxidative stress induction by T-2 toxin causes DNA damage and triggers apoptosis via caspase pathway in human cervical cancer cells. *Toxicology* 262 :153–161. doi : 10.1016/j.tox.2009.06.002.
- Cherla RP, Lee S-Y, Mulder RA, *et al.* (2009) Shiga Toxin 1-Induced Proinflammatory Cytokine Production Is Regulated by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway. *Infect Immun* 77 :3919–3931. doi : 10.1128/IAI.00738-09.
- Ching JCY, Jones NL, Ceponis PJM, *et al.* (2002) *Escherichia coli* Shiga-Like Toxins Induce Apoptosis and Cleavage of Poly(ADP-Ribose) Polymerase via *In Vitro* Activation of Caspases. *Infect Immun* 70 :4669–4677. doi : 10.1128/IAI.70.8.4669-4677.2002.
- Ciccarelli FD, Doerks T, von Mering C, *et al.* (2006) Toward Automatic Reconstruction of a Highly Resolved Tree of Life. *Science* 311 :1283–1287. doi : 10.1126/science.1123061.
- Cundliffe E, Davies JE (1977) Inhibition of Initiation, Elongation, and Termination of Eukaryotic Protein Synthesis by Trichothecene Fungal Toxins. *Antimicrob Agents Chemother* 11 :491–499. doi : 10.1128/AAC.11.3.491.
- Dai Y, Xie H, Xu Y (2017) Evaluation of deoxynivalenol-induced toxic effects on mouse endometrial stromal cells : Cell apoptosis and cell cycle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 483 :572–577. doi : 10.1016/j.bbrc.2016.12.103.
- Dallal JA, Irvin JD (1978) Enzymatic inactivation of eukaryotic ribosomes by the pokeweed antiviral protein. *FEBS Letters* 89 :257–259. doi : 10.1016/0014-5793(78)80230-0.
- Dellafiora L, Galaverna G, Dall’Asta C (2017) In silico analysis sheds light on the structural basis underlying the ribotoxicity of trichothecenes—A tool for supporting the hazard identification process. *Toxicology Letters* 270 :80–87. doi : 10.1016/j.toxlet.2017.02.015.
- Deng C, Ji C, Qin W, *et al.* (2016) Deoxynivalenol inhibits proliferation and induces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 43 :232–241. doi : 10.1016/j.etap.2016.02.002.

- Dikic I, Elazar Z (2018) Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19 :349–364. doi : 10.1038/s41580-018-0003-4.
- Dinu D, Bodea GO, Ceapa CD, *et al.* (2011) Adapted response of the antioxidant defense system to oxidative stress induced by deoxynivalenol in Hek-293 cells. *Toxicon* 57 :1023–1032. doi : 10.1016/j.toxicon.2011.04.006.
- El-Aouar Filho RA, Nicolas A, De Paula Castro TL, *et al.* (2017) Heterogeneous Family of Cyclomodulins : Smart Weapons That Allow Bacteria to Hijack the Eukaryotic Cell Cycle and Promote Infections. *Front Cell Infect Microbiol* 7 :208. doi : 10.3389/fcimb.2017.00208.
- Eskola M, Kos G, Elliott CT, *et al.* (2020) Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins : Validity of the widely cited ‘FAO estimate’ of 25. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 60 :2773-2789. doi : 10.1080/10408398.2019.1658570.
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (2021) The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFS2* 19 :. doi : 10.2903/j.efsa.2021.6971.
- Exeni RA, Fernandez-Brando RJ, Santiago AP, *et al.* (2018) Pathogenic role of inflammatory response during Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatr Nephrol* 33 :2057–2071. doi : 10.1007/s00467-017-3876-0.
- Fæste CK, Solhaug A, Gaborit M, *et al.* (2022) Neurotoxic Potential of Deoxynivalenol in Murine Brain Cell Lines and Primary Hippocampal Cultures. *Toxins* 14 :48. doi : 10.3390/toxins14010048.
- Finlay BB, Falkow S (1997) Common Themes in Microbial Pathogenicity Revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 61 :34.
- Foster GH, Tesh VL (2002) Shiga toxin 1-induced activation of c-Jun NH₂-terminal kinase and p38 in the human monocytic cell line THP-1 : possible involvement in the production of TNF- α . *J Leukocyte Bio* 71 :107–114. doi : 10.1189/jlb.71.1.107.
- Fujii J, Matsui T, Heatherly DP, *et al.* (2003) Rapid Apoptosis Induced by Shiga Toxin in HeLa Cells. *Infect Immun* 71 :2724–2735. doi : 10.1128/IAI.71.5.2724-2735.2003.
- Fujii J, Wood K, Matsuda F, *et al.* (2008) Shiga Toxin 2 Causes Apoptosis in Human Brain Microvascular Endothelial Cells via C/EBP Homologous Protein. *Infect Immun* 76 :3679–3689. doi : 10.1128/IAI.01581-07.
- Gao Y, Meng L, Liu H, *et al.* (2020) The Compromised Intestinal Barrier Induced by Mycotoxins. *Toxins* 12 :619. doi : 10.3390/toxins12100619.
- García GR, Payros D, Pinton P, *et al.* (2018) Intestinal toxicity of deoxynivalenol is limited by *Lactobacillus rhamnosus* RC007 in pig jejunum explants. *Arch Toxicol* 92 :983–993. doi : 10.1007/s00204-017-2083-x.

- Garofalo M, Payros D, Oswald E, *et al.* (2022) The foodborne contaminant deoxynivalenol exacerbates DNA damage caused by a broad spectrum of genotoxic agents. *Science of The Total Environment* 820 :153280. doi : 10.1016/j.scitotenv.2022.153280.
- Garofalo M, Payros D, Penary M, *et al.* (2023) A novel toxic effect of foodborne trichothecenes : the exacerbation of genotoxicity. *Environ Pollut.* 18 :317 :120625. doi : 10.1016/j.envpol.2022.120625.
- Garreau de Loubresse N, Prokhorova I, Holtkamp W, *et al.* (2014) Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome. *Nature* 513 :517–522. doi : 10.1038/nature13737.
- Ge L, Lin Z, Le G, *et al.* (2020) Nontoxic-dose deoxynivalenol aggravates lipopolysaccharides-induced inflammation and tight junction disorder in IPEC-J2 cells through activation of NF- κ B and LC3B. *Food and Chemical Toxicology* 145 :111712. doi : 10.1016/j.fct.2020.111712.
- Gilles A, Frechin L, Natchiar K, *et al.* (2020) Targeting the Human 80S Ribosome in Cancer : From Structure to Function and Drug Design for Innovative Adjuvant Therapeutic Strategies. *Cells* 9 :629. doi : 10.3390/cells9030629.
- Gomez SA, Abrey-Recalde MJ, Panek CA, *et al.* (2013) The oxidative stress induced *in vivo* by Shiga toxin-2 contributes to the pathogenicity of haemolytic uraemic syndrome. *Clinical and Experimental Immunology* 173 :463–472. doi : 10.1111/cei.12124.
- Gray JS, Bae HK, Li JCB, *et al.* (2008) Double-Stranded RNA–Activated Protein Kinase Mediates Induction of Interleukin-8 Expression by Deoxynivalenol, Shiga Toxin 1, and Ricin in Monocytes. *Toxicol Sci* 105 :322–330. doi : 10.1093/toxsci/kfn128.
- Guo H, Ji J, Wei K, *et al.* (2021) MAPK/AP-1 and ROS participated in ratio- and time-dependent interaction effects of deoxynivalenol and cadmium on HT-29 cells. *Food and Chemical Toxicology* 148 :111921. doi : 10.1016/j.fct.2020.111921.
- Hamshou M, Shang C, De Zaeytijd J, *et al.* (2017) Expression of ribosome-inactivating proteins from apple in tobacco plants results in enhanced resistance to *Spodoptera exigua*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 20 :1–5. doi : 10.1016/j.aspen.2016.09.009.
- Hasuda AL, Person E, Khoshal AK, *et al.* (2022) Deoxynivalenol induces apoptosis and inflammation in the liver : Analysis using precision-cut liver slices. *Food and Chemical Toxicology* 163 :112930. doi : 10.1016/j.fct.2022.112930.
- He Y, Yin X, Dong J, *et al.* (2021) Transcriptome Analysis of Caco-2 Cells upon the Exposure of Mycotoxin Deoxynivalenol and Its Acetylated Derivatives. *Toxins* 13 :167. doi : 10.3390/toxins13020167.
- Hetz C (2012) The unfolded protein response : controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 :89–102. doi : 10.1038/nrm3270.
- Hooft JM, Bureau DP (2021) Deoxynivalenol : Mechanisms of action and its effects on various terrestrial and aquatic species. *Food and Chemical Toxicology* 157 :112616. doi : 10.1016/j.fct.2021.112616.

- Ikeda M, Gunji Y, Yamasaki S, Takeda Y (2000) Shiga toxin activates p38 MAP kinase through cellular Ca²⁺ increase in Vero cells. *FEBS Letters* 485 :94–98. doi : 10.1016/S0014-5793(00)02204-3.
- Iordanov MS, Pribnow D, Magun JL, *et al.* (1997) Ribotoxic Stress Response : Activation of the Stress-Activated Protein Kinase JNK1 by Inhibitors of the Peptidyl Transferase Reaction and by Sequence-Specific RNA Damage to the a-Sarcin/Ricin Loop in the 28S rRNA. *Mol Cell Biol* 17 :9. doi : 10.1128/MCB.17.6.3373.
- Jandhyala DM, Ahluwalia A, Obrig T, Thorpe CM (2008) ZAK : a MAP3Kinase that transduces Shiga toxin- and ricin-induced proinflammatory cytokine expression. *Cell Microbiol* 10 :1468–1477. doi : 10.1111/j.1462-5822.2008.01139.x.
- Jandhyala DM, Rogers TJ, Kane A, *et al.* (2010) Shiga Toxin 2 and Flagellin from Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* Superinduce Interleukin-8 through Synergistic Effects on Host Stress-Activated Protein Kinase Activation. *Infect Immun* 78 :2984–2994. doi : 10.1128/IAI.00383-10.
- Juan-García A, Taroncher M, Font G, Ruiz M-J (2018) Micronucleus induction and cell cycle alterations produced by deoxynivalenol and its acetylated derivatives in individual and combined exposure on HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology* 118 :719–725. doi : 10.1016/j.fct.2018.06.024.
- Kaminska B (2005) MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1754 :253–262. doi : 10.1016/j.bbapap.2005.08.017.
- Kamle M, Mahato DK, Gupta A, *et al.* (2022) Deoxynivalenol : An Overview on Occurrence, Chemistry, Biosynthesis, Health Effects and Its Detection, Management, and Control Strategies in Food and Feed. *Microbiology Research* 13 :292–314. doi : 10.3390/microbiolres13020023.
- Karpman D, Håkansson A, Perez M-TR, *et al.* (1998) Apoptosis of Renal Cortical Cells in the Hemolytic-Uremic Syndrome : *In Vivo* and *In Vitro* Studies. *Infect Immun* 66 :636–644. doi : 10.1128/IAI.66.2.636-644.1998.
- Karpman D, Loos S, Tati R, Arvidsson I (2017) Haemolytic uraemic syndrome. *J Intern Med* 281 :123–148. doi : 10.1111/joim.12546.
- Katika MR, Hendriksen PJM, van Loveren H, A. C. M. Peijnenburg A (2015) Characterization of the modes of action of deoxynivalenol (DON) in the human Jurkat T-cell line. *Journal of Immunotoxicology* 12 :206–216. doi : 10.3109/1547691X.2014.925995.
- Kausche F, Dean E, Arp L, *et al.* An experimental model for subclinical edema disease (*Escherichia coli* enterotoxemia) manifest as vascular necrosis in pigs. *Am J Vet Res* 53 :281–7.
- Keepers TR, Psotka MA, Gross LK, Obrig TG (2006) A Murine Model of HUS : Shiga Toxin with Lipopolysaccharide Mimics the Renal Damage and Physiologic Response of Human Disease. *JASN* 17 :3404–3414. doi : 10.1681/ASN.2006050419.

- Knutsen HK, Alexander J, Barregård L, *et al.* (2017) Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA Journal* 15 :. doi : 10.2903/j.efsa.2017.4718.
- Kodama T, Nagayama K, Yamada K, *et al.* (1999) Induction of apoptosis in human renal proximal tubular epithelial cells by *Escherichia coli* verocytotoxin 1 *in vitro*. *Medical Microbiology and Immunology* 188 :73–78. doi : 10.1007/s004300050107.
- Koonin EV (2003) Comparative genomics, minimal gene-sets and the last universal common ancestor. *Nat Rev Microbiol* 1 :127–136. doi : 10.1038/nrmicro751.
- Kouadio JH, Mobio TA, Baudrimont I, *et al.* (2005) Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology* 213 :56–65. doi : 10.1016/j.tox.2005.05.010.
- Koudelka GB, Arnold JW, Chakraborty D (2018) Evolution of STEC virulence : Insights from the antipredator activities of Shiga toxin producing *E. coli*. *International Journal of Medical Microbiology* 308 :956–961. doi : 10.1016/j.ijmm.2018.07.001.
- Krishnaswamy R, Devaraj SN, Padma VV (2010) Lutein protects HT-29 cells against Deoxynivalenol-induced oxidative stress and apoptosis : Prevention of NF- κ B nuclear localization and down regulation of NF- κ B and Cyclo-Oxygenase – 2 expression. *Free Radical Biology and Medicine* 49 :50–60. doi : 10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.016.
- Laskin JD (2002) The Ribotoxic Stress Response as a Potential Mechanism for MAP Kinase Activation in Xenobiotic Toxicity. *Toxicological Sciences* 69 :289–291. doi : 10.1093/toxsci/69.2.289.
- Lebrun B (2015) Dysregulation of energy balance by trichothecene mycotoxins : Mechanisms and prospects. *Neurotoxicology*. 49 :15-27. doi : 10.1016/j.neuro.2015.04.009.
- Lee M-S, Cherla RP, Jenson MH, *et al.* (2011) Shiga toxins induce autophagy leading to differential signalling pathways in toxin-sensitive and toxin-resistant human cells : Shiga toxin-induced autophagy. *Cellular Microbiology* 13 :1479–1496. doi : 10.1111/j.1462-5822.2011.01634.x.
- Lee M-S, Cherla RP, Tesh VL (2010) Shiga Toxins : Intracellular Trafficking to the ER Leading to Activation of Host Cell Stress Responses. *Toxins* 2 :1515–1535. doi : 10.3390/toxins2061515.
- Lee M-S, Tesh V (2019) Roles of Shiga Toxins in Immunopathology. *Toxins* 11 :212. doi : 10.3390/toxins11040212.
- Lee S-Y, Cherla RP, Caliskan I, Tesh VL (2005) Shiga Toxin 1 Induces Apoptosis in the Human Myelogenous Leukemia Cell Line THP-1 by a Caspase-8-Dependent, Tumor Necrosis Factor Receptor-Independent Mechanism. *Infect Immun* 73 :5115–5126. doi : 10.1128/IAI.73.8.5115-5126.2005.
- Lee S-Y, Lee M-S, Cherla RP, Tesh VL (2008) Shiga toxin 1 induces apoptosis through the endoplasmic reticulum stress response in human monocytic cells. *Cellular Microbiology* 10 :770–780. doi : 10.1111/j.1462-5822.2007.01083.x.

- Lei Y, Guanghai Z, Xi W, *et al.* (2017) Cellular responses to T-2 toxin and/or deoxynivalenol that induce cartilage damage are not specific to chondrocytes. *Sci Rep* 7 :2231. doi : 10.1038/s41598-017-02568-5.
- Lentz EK, Leyva-Illades D, Lee M-S, *et al.* (2011) Differential Response of the Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cell Line HK-2 to Shiga Toxin Types 1 and 2. *Infect Immun* 79 :3527–3540. doi : 10.1128/IAI.05139-11.
- Levine B, Kroemer G (2008) Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* 132 :27–42. doi : 10.1016/j.cell.2007.12.018.
- Li D, Ye Y, Lin S, *et al.* (2014) Evaluation of deoxynivalenol-induced toxic effects on DF-1 cells *in vitro* : Cell-cycle arrest, oxidative stress, and apoptosis. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37 :141–149. doi : 10.1016/j.etap.2013.11.015.
- Li M, Pestka JJ (2008) Comparative Induction of 28S Ribosomal RNA Cleavage by Ricin and the Trichothecenes Deoxynivalenol and T-2 Toxin in the Macrophage. *Toxicological Sciences* 105 :67–78. doi : 10.1093/toxsci/kfn111.
- Lin J, Huang F, Liang T, *et al.* (2021) EPA and DHA confer protection against deoxynivalenol-induced endoplasmic reticulum stress and iron imbalance in IPEC-1 cells. *British Journal of Nutrition* 128 :161–171. doi : DOI : 10.1017/s0007114521003688.
- Liu S, Kang W, Mao X, *et al.* (2022) Low dose of arsenic exacerbates toxicity to mice and IPEC-J2 cells exposed with deoxynivalenol : Aryl hydrocarbon receptor and autophagy might be novel therapeutic targets. *Science of The Total Environment* 832 :155027. doi : 10.1016/j.scitotenv.2022.155027.
- Lopez E, Contrini MM, Devoto S, De Rosa MF Tumor necrosis factor concentrations in hemolytic uremic syndrome patients and children with bloody diarrhea in Argentina. *Pediatr Infect Dis J* 594–8.
- Lucioli J, Pinton P, Callu P, *et al.* (2013) The food contaminant deoxynivalenol activates the mitogen activated protein kinases in the intestine : Interest of *ex vivo* models as an alternative to *in vivo* experiments. *Toxicon* 66 :31–36. doi : 10.1016/j.toxicon.2013.01.024.
- Maise I, Cornick NA, Samuel JE, Moon HW (2003) Binding of Shiga Toxin 2e to Porcine Erythrocytes *In Vivo* and *In Vitro*. *Infect Immun* 71 :5194–5201. doi : 10.1128/IAI.71.9.5194-5201.2003.
- Matussek A, Lauber J, Bergau A, *et al.* (2003) Molecular and functional analysis of Shiga toxin-induced response patterns in human vascular endothelial cells. *Blood* 102 :1323–1332. doi : 10.1182/blood-2002-10-3301.
- Melton-Celsa AR (2014) Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr* 2 :2.4.06. doi : 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013.
- Mishra S, Dwivedi PD, Pandey HP, Das M (2014) Role of oxidative stress in Deoxynivalenol induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology* 72 :20–29. doi : 10.1016/j.fct.2014.06.027.

- Mishra S, Tewari P, Chaudhari BP, *et al.* (2016) Deoxynivalenol induced mouse skin tumor initiation : Elucidation of molecular mechanisms in human HaCaT keratinocytes : Skin tumor initiation by deoxynivalenol. *Int J Cancer* 139 :2033–2046. doi : 10.1002/ijc.30260
- Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, *et al.* (2014) Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants & Redox Signaling* 20 :1126–1167. doi : 10.1089/ars.2012.5149.
- Moens U, Kostenko S, Sveinbjörnsson B (2013) The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinases (MAPKAPKs) in Inflammation. *Genes* 4 :101–133. doi : 10.3390/genes4020101.
- Obrig TG, Karpman D (2011) Shiga Toxin Pathogenesis : Kidney Complications and Renal Failure : Ricin and Shiga Toxins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 357 :105-36. doi : 10.1007/82_2011_172.
- Park J-Y, Jeong Y-J, Park S-K, *et al.* (2017) Shiga Toxins Induce Apoptosis and ER Stress in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Toxins* 9 :319. doi : 10.3390/toxins9100319.
- Payros D, Alassane-Kpembi I, Laffitte J, *et al.* (2021) Dietary Exposure to the Food Contaminant Deoxynivalenol Triggers Colonic Breakdown by Activating the Mitochondrial and the Death Receptor Pathways. *Mol Nutr Food Res* 65 :2100191. doi : 10.1002/mnfr.202100191.
- Payros D, Alassane-Kpembi I, Pierron A, *et al.* (2016) Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms. *Arch Toxicol* 90 :2931–2957. doi : 10.1007/s00204-016-1826-4.
- Payros D, Dobrindt U, Martin P, *et al.* (2017) The Food Contaminant Deoxynivalenol Exacerbates the Genotoxicity of Gut Microbiota. *mBio* 14 ;8(2) :e00007-17. doi : 10.1128/mBio.00007-17.
- Payros D, Ménard S, Laffitte J, *et al.* (2020) The food contaminant, deoxynivalenol, modulates the Thelper/Treg balance and increases inflammatory bowel diseases. *Arch Toxicol* 94 :3173–3184. doi : 10.1007/s00204-020-02817-z.
- Pestka JJ (2010) Deoxynivalenol-Induced Proinflammatory Gene Expression : Mechanisms and Pathological Sequelae. *Toxins* 2 :1300–1317. doi : 10.3390/toxins2061300.
- Pestka JJ (2008) Mechanisms of Deoxynivalenol-Induced Gene Expression and Apoptosis. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 25 :1128–1140.
- Pierron A, Mimoun S, Murate LS, *et al.* (2016) Microbial biotransformation of DON : molecular basis for reduced toxicity. *Sci Rep* 6 :29105. doi : 10.1038/srep29105.
- Pijpers AH, van Setten PA, van Den Heuvel LP, Assman KJ Verocytotoxin-Induced Apoptosis of Human Microvascular Endothelial Cells. *J Am Soc Nephrol* 767–778.

- Pinatih KJP, Suardana IW, Widiastih DA, Suharsono H (2021) Shiga-Like Toxin Produced by Local Isolates of *Escherichia coli* O157 :H7 Induces Apoptosis of the T47 Breast Cancer Cell Line. *Breast Cancer (Auckl)* 15 :117822342110101. doi : 10.1177/11782234211010120.
- Pinton P, Braicu C, Nougayrede J-P, *et al.* (2010) Deoxynivalenol Impairs Porcine Intestinal Barrier Function and Decreases the Protein Expression of Claudin-4 through a Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Mechanism. *The Journal of Nutrition* 140 :1956–1962. doi : 10.3945/jn.110.123919.
- Pinton P, Graziani F, Pujol A, *et al.* (2015) Deoxynivalenol inhibits the expression by goblet cells of intestinal mucins through a PKR and MAP kinase dependent repression of the resistin-like molecule β . *Mol Nutr Food Res* 59 :1076–1087. doi : 10.1002/mnfr.201500005.
- Pinton P, Nougayrède J-P, Del Rio J-C, *et al.* (2009) The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicology and Applied Pharmacology* 237 :41–48. doi : 10.1016/j.taap.2009.03.003.
- Pinton P, Oswald IP (2014) Effect of Deoxynivalenol and Other Type B Trichothecenes on the Intestine : A Review. *Toxins (Basel)*. 6 :1615-43. doi : 10.3390/toxins6051615.
- Pinton P, Tsybulskyy D, Lucioli J, *et al.* (2012) Toxicity of Deoxynivalenol and Its Acetylated Derivatives on the Intestine : Differential Effects on Morphology, Barrier Function, Tight Junction Proteins, and Mitogen-Activated Protein Kinases. *Toxicological Sciences* 130 :180–190. doi : 10.1093/toxsci/kfs239.
- Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, *et al.* (2017) Oxidative Stress : Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017 :1–13. doi : 10.1155/2017/8416763.
- Platnich JM, Chung H, Lau A, *et al.* (2018) Shiga Toxin/Lipopolysaccharide Activates Caspase-4 and Gasdermin D to Trigger Mitochondrial Reactive Oxygen Species Upstream of the NLRP3 Inflammasome. *Cell Reports* 25 :1525-1536.e7. doi : 10.1016/j.celrep.2018.09.071.
- Ramegowda B, Tesh VL (1996) Differentiation-associated toxin receptor modulation, cytokine production, and sensitivity to Shiga-like toxins in human monocytes and monocytic cell lines. *Infect Immun* 64 :1173–1180. doi : 10.1128/iai.64.4.1173-1180.1996.
- Robinson KS, Toh GA, Rozario P, *et al.* (2022) ZAKa-driven ribotoxic stress response activates the human NLRP1 inflammasome. *Science*. 377 :328-335. doi : 10.1126/science.abl6324.
- Rocha O, Ansari K, Doohan FM (2005) Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells : A review. *Food Additives and Contaminants* 22 :369–378. doi : 10.1080/02652030500058403.
- Rodnina MV, Wintermeyer W (2003) Peptide bond formation on the ribosome : structure and

- mechanism. *Current Opinion in Structural Biology* 13 :334–340. doi : 10.1016/S0959-440X(03)00065-4.
- Rudolph MJ, Davis SA, Tumer NE, Li X-P (2020) Structural basis for the interaction of Shiga toxin 2a with a C-terminal peptide of ribosomal P stalk proteins. *Journal of Biological Chemistry* 295 :15588–15596. doi : 10.1074/jbc.AC120.015070.
- Saenz JB, Li J, Haslam DB (2010) The MAP kinase-activated protein kinase 2 (MK2) contributes to the Shiga toxin-induced inflammatory response. *Cellular Microbiology* 12 :516–529. doi : 10.1111/j.1462-5822.2009.01414.x.
- Sahu SC, Garthoff LH, Robl MG, *et al.* (2008) Rat liver clone-9 cells in culture as a model for screening hepatotoxic potential of food-related products : hepatotoxicity of deoxynivalenol. *J Appl Toxicol* 28 :765–772. doi : 10.1002/jat.1337.
- Sahu SC, O'Donnell MW, Wiesenfeld PL (2010) Comparative hepatotoxicity of deoxynivalenol in rat, mouse and human liver cells in culture. *J Appl Toxicol* 30 :566–573. doi : 10.1002/jat.1527.
- Sakiri R, Ramegowda B, Tesh VL (1998) Shiga Toxin Type 1 Activates Tumor Necrosis Factor- α Gene Transcription and Nuclear Translocation of the Transcriptional Activators Nuclear Factor- κ B and Activator Protein-1. *Blood* 92 :558–566. doi : 10.1182/blood.V92.2.558.
- Sandvig K, Bergan J, Dyve A-B, *et al.* (2010) Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin. *Toxicon* 56 :1181–1185. doi : 10.1016/j.toxicon.2009.11.021.
- Schüller S (2011) Shiga Toxin Interaction with Human Intestinal Epithelium. *Toxins (Basel)* 3 :626–39. doi : 10.3390/toxins3060626.
- Shi Y, Porter K, Parameswaran N, *et al.* (2009) Role of GRP78/BiP Degradation and ER Stress in Deoxynivalenol-Induced Interleukin-6 Upregulation in the Macrophage. *Toxicological Sciences* 109 :247–255. doi : 10.1093/toxsci/kfp060.
- Skrzydlewski P, Twarużek M, Grajewski J (2022) Cytotoxicity of Mycotoxins and Their Combinations on Different Cell Lines : A Review. *Toxins* 14 :244. doi : 10.3390/toxins14040244.
- Smith WE, Kane AV, Campbell ST, *et al.* (2003) Shiga Toxin 1 Triggers a Ribotoxic Stress Response Leading to p38 and JNK Activation and Induction of Apoptosis in Intestinal Epithelial Cells. *Infect Immun* 71 :1497–1504. doi : 10.1128/IAI.71.3.1497-1504.2003.
- Steitz TA (2008) A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 :242–253. doi : 10.1038/nrm2352.
- Streit E, Naehrer K, Rodrigues I, Schatzmayr G (2013) Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide : long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93 :2892–2899. doi : 10.1002/jsfa.6225.
- Takahashi M (2003) Regulation of a Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase, MLTK by PKN. *Journal of Biochemistry* 133 :181–187. doi : 10.1093/jb/mvg022.

- Tang B, Li Q, Zhao X, *et al.* (2015a) Shiga toxins induce autophagic cell death in intestinal epithelial cells via the endoplasmic reticulum stress pathway. *Autophagy* 11 :344–354. doi : 10.1080/15548627.2015.1023682.
- Tang Y, Li J, Li F, *et al.* (2015b) Autophagy protects intestinal epithelial Cells against Deoxynivalenol toxicity by alleviating oxidative stress via IKK signaling pathway. *Free Radical Biology and Medicine* 89 :944–951. doi : 10.1016/j.freeradbiomed.2015.09.012.
- Thorpe CM, Smith WE, Hurley BP, Acheson DWK (2001) Shiga Toxins Induce, Superinduce, and Stabilize a Variety of C-X-C Chemokine mRNAs in Intestinal Epithelial Cells, Resulting in Increased Chemokine Expression. *Infect Immun* 69 :6140–6147. doi : 10.1128/IAI.69.10.6140-6147.2001.
- Tumer NE, Li X-P (2011) Interaction of Ricin and Shiga Toxins with Ribosomes. *Curr Top Microbiol Immunol.* 357 :1-18. doi : 10.1007/82_2011_174.
- Tyrer PC, Frizelle FA, Keenan JI (2014) *Escherichia coli*-derived outer membrane vesicles are genotoxic to human enterocyte-like cells. *Infect Agents Cancer* 9 :2. doi : 10.1186/1750-9378-9-2.
- van Setten PA, Monnens LAH, Verstraten RGG, van Hinsbergh WM Effects of Verocytotoxin-1 on Nonadherent Human Monocytes : Binding Characteristics, Protein Synthesis, and Induction of Cytokine Release. *Blood* 88 :174-83.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003) The cell cycle : a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer : *Cell cycle regulation and deregulation.* *Cell Proliferation* 36 :131–149. doi : 10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x.
- Vind AC, Snieckute G, Blasius M, *et al.* (2020) ZAK α Recognizes Stalled Ribosomes through Partially Redundant Sensor Domains. *Molecular Cell* 78 :700-713.e7. doi : 10.1016/j.molcel.2020.03.021.
- Wadolkowski EA, Sung LM, Burris JA, *et al.* (1990) Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce Shiga-like toxin type II. *Infect Immun* 58 :3959–3965. doi : 10.1128/iai.58.12.3959-3965.1990.
- Walsh MJ, Dodd JE, Hautbergue GM (2013) Ribosome-inactivating proteins : Potent poisons and molecular tools. *Virulence* 4 :774–784. doi : 10.4161/viru.26399.
- Wang W, Zhu Y, Abraham N, *et al.* (2021) The Ribosome-Binding Mode of Trichothecene Mycotoxins Rationalizes Their Structure—Activity Relationships. *IJMS* 22 :1604. doi : 10.3390/ijms22041604.
- Whitmarsh AJ, Davis RJ (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways : *J Mol Med* 74 :589–607. doi : 10.1007/s001090050063.

- Wilkinson MG, Millar JBA (2000) Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *FASEB j* 14 :2147–2157. doi : 10.1096/fj.00-0102rev.
- Williams, Clarke (1998) Why do microbes have toxins? *Journal of Applied Microbiology* 84 :1S-6S. doi : 10.1046/j.1365-2672.1998.0840s101S.x.
- Wu CC-C, Peterson A, Zinshteyn B, *et al.* (2020) Ribosome Collisions Trigger General Stress Responses to Regulate Cell Fate. *Cell* 182 :404-416.e14. doi : 10.1016/j.cell.2020.06.006.
- Wu GS (2004) The functional Interactions Between the MAPK and p53 Signaling Pathways. *Cancer Biology & Therapy* 3 :156–161. doi : 10.4161/cbt.3.2.614.
- Wu Q, Wang X, Nepovimova E, *et al.* (2017) Trichothecenes : immunomodulatory effects, mechanisms, and anti-cancer potential. *Arch Toxicol* 91 :3737–3785. doi : 10.1007/s00204-017-2118-3.
- Xu B, Liu L, Song G (2022) Functions and Regulation of Translation Elongation Factors. *Front Mol Biosci* 8 :816398. doi : 10.3389/fmolb.2021.816398.
- Yamamoto T, Nagayama K, Satomura K, *et al.* (2000) Increased Serum IL-10 and Endothelin Levels in Hemolytic Uremic Syndrome Caused by *Escherichia coli* O157. *Nephron* 84 :326–332. doi : 10.1159/000045607.
- Yang H, Chung DH, Kim YB, *et al.* (2008) Ribotoxic mycotoxin deoxynivalenol induces G2/M cell cycle arrest via p21Cip/WAF1 mRNA stabilization in human epithelial cells. *Toxicology* 243 :145–154. doi : 10.1016/j.tox.2007.10.002.
- You L, Zhao Y, Kuca K, *et al.* (2021) Hypoxia, oxidative stress, and immune evasion : a trinity of the trichothecenes T-2 toxin and deoxynivalenol (DON). *Arch Toxicol* 95 :1899–1915. doi : 10.1007/s00204-021-03030-2.
- Yuan L, Mu P, Huang B, *et al.* (2018) EGR1 is essential for deoxynivalenol-induced G2/M cell cycle arrest in HepG2 cells via the ATF3 Δ Zip2a/2b-EGR1-p21 pathway. *Toxicology Letters* 299 :95–103. doi : 10.1016/j.toxlet.2018.09.012.
- Yue J, López JM (2020) Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis. *IJMS* 21 :2346. doi : 10.3390/ijms21072346.
- Zhang H, Deng X, Zhou C, *et al.* (2020) Deoxynivalenol Induces Inflammation in IPEC-J2 Cells by Activating P38 Mapk And Erk1/2. *Toxins* 12 :180. doi : 10.3390/toxins12030180.
- Zhang J, Geng H, Liu L, Zhang H (2019) Synergistic cytotoxicity of homoharringtonine and etoposide in acute myeloid leukemia cells involves disrupted antioxidant defense. *CMAR Volume* 11 :1023–1032. doi : 10.2147/CMAR.S187597.
- Zhou H-R, Islam Z, Pestka JJ (2005) Induction of Competing Apoptotic and Survival Signaling Pathways in the Macrophage by the Ribotoxic Trichothecene Deoxynivalenol. *Toxicological Sciences* 87 :113–122. doi : 10.1093/toxsci/kfi234

Zhou H-R, He K, Landgraf J, *et al.* (2014) Direct Activation of Ribosome-Associated Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase (PKR) by Deoxynivalenol, Anisomycin and Ricin : A New Model for Ribotoxic Stress Response Induction. *Toxins* 6 :3406–3425. doi : 10.3390/toxins6123406.

Zoja C, Angioletti S, Donadelli R, *et al.* (2002) Shiga toxin-2 triggers endothelial leukocyte adhesion and transmigration via NF- κ B dependent up-regulation of IL-8 and MCP-11. *Kidney International* 62 :846–856. doi : 10.1046/j.1523-1755.2002.00503.x.

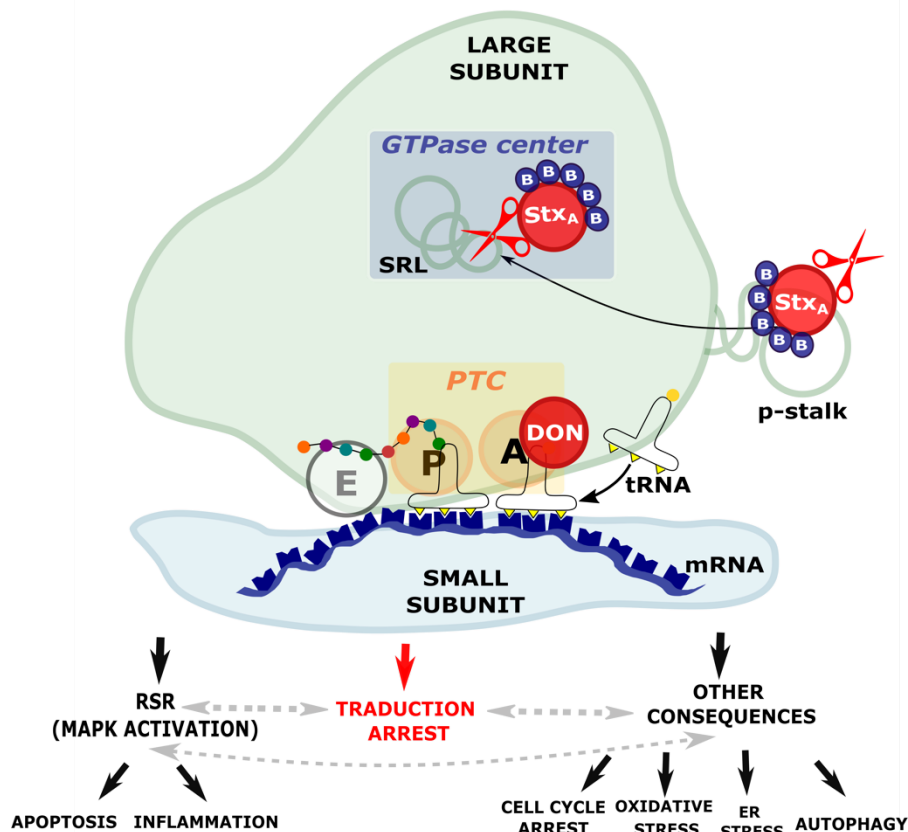


Figure 1 : Interaction of DON and Stx with the eukaryotic ribosome and its consequences.

Stx interacts with the p-stalk to join the sarcin ricin loop (SRL), a particular zone in the GTPase center which is implicated in the binding of elongation factors to the ribosome. Stx induce ribosomal RNA cleavage to the SRL through its enzymatic activity. DON induce steric hindrance by binding to A site of the peptidyl transferase center (PTC) and prevent the interaction of the ribosome with the tRNA. Both DON and Stx results in protein synthesis inhibition. Binding of Stx and DON on the ribosome induce the ribotoxic stress response (RSR), which is responsible for apoptosis, inflammation but also other consequences such as cell cycle arrest, endoplasmic resticulum (ER) stress, oxidative stress, and autophagy.

**INTRODUCTION AU TRAVAIL
EXPERIMENTAL**

I. Positionnement du sujet

Par sa présence dans le tractus intestinal, la colibactine partage son microenvironnement proche avec de nombreuses molécules apportées par l'alimentation, dont des toxines. En 2017, une étude a abordé l'effet de l'alimentation sur le potentiel génotoxique de la colibactine (Payros *et al.*, 2017). Notamment, cette étude a émis l'hypothèse selon laquelle le DON, contaminant alimentaire ubiquitaire, pourrait moduler l'effet de la génotoxine colibactine. Pour répondre à cette hypothèse, des cellules intestinales épithéliales de rat (IEC-6) ont été infectées avec des souches d'*E. coli* productrices de colibactine (*E. coli* WT), ou incapables à produire la toxine sous sa forme active (*E. coli* $\Delta clbP$ et $\Delta clbA$) à différentes doses (ou « MOI » pour *Multiplicity of Infection*, ou nombre de cellules d'*E. coli* par cellules eucaryotes au moment de l'infection), et co-traitées avec du DON. Les dommages à l'ADN induits par la colibactine ont été mesurés à l'aide du marqueur de dommages à l'ADN γ H2AX. *In vivo*, des rats ont été colonisés dès la naissance avec les souches d'*E. coli* décrites ci-dessus, et nourris avec une alimentation contaminée en DON, puis les dommages à l'ADN ont été évalués dans le jéjunum. Ces deux expérimentations ont permis de démontrer que les dommages à l'ADN induits par la colibactine sont exacerbés en présence de DON, malgré l'absence de potentiel génotoxique du DON seul (**figure 11**). De ce fait, cette étude a suggéré que le DON pourrait moduler la cancérogénèse induite par la colibactine (Payros *et al.*, 2017).

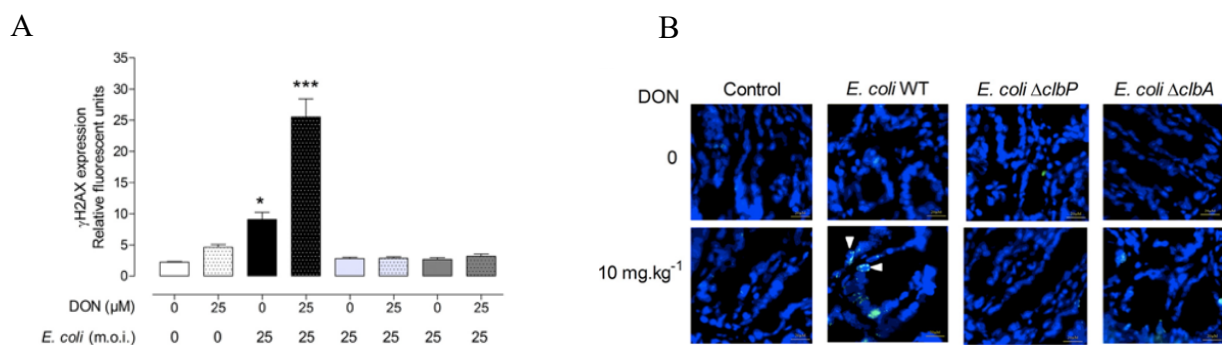


Figure 11 : Exacerbation de la génotoxicité de la colibactine par le DON. A : Cellules IEC-6 infectées pendant 4h par des souches d'*E. coli* produisant de la colibactine (*E. coli* WT) ou ne produisant pas de colibactine (*E. coli* $\Delta clbA$ et *E. coli* $\Delta clbP$) (MOI de 25) et coexposées à 25 μ M de DON 8 h avant la quantification de γ H2AX par Western in-cell). B : Analyse par immunofluorescence de l'épithélium jéjunal d'adultes colonisés depuis la naissance par les différentes souches d'*E.* ou traités avec du PBS (groupe contrôle) et coexposés à un régime alimentaire contaminé par le DON (10 mg/kg) pendant 4 semaines ou non coexposés à un régime alimentaire contaminé par le DON pendant 4 semaines.). Coupes congelées représentatives du jéjunum des rats adultes. L'ADN est coloré en bleu. Les foyers γ H2AX sont représentés en vert. Barres = 10 μ M. Extrait de Payros *et al.*, 2017.

II. Objectifs de la thèse

A. Problématique

Un nouvel effet du DON a récemment été découvert : le DON augmente la génotoxicité induite par une génotoxine bactérienne produite par le microbiote intestinal, la colibactine (Payros *et al.*, 2017). Comme les dommages à l'ADN induits par la colibactine pourraient favoriser le développement de cancers colorectaux, ce nouvel effet du DON pourrait révéler un pouvoir pro-carcinogène du DON, qui n'est pas génotoxique en lui-même. Les mécanismes sous-jacents à ce nouvel effet du DON n'ont pas été évalués à ce jour. Comme décrit dans l'introduction de cette thèse, l'exposome inclut de multiples génotoxines et ribotoxines aux modes d'actions divers. L'objectif de cette étude est donc de définir si l'exacerbation de la génotoxicité est applicable à d'autres mélanges entre ribotoxines et génotoxines, et de proposer des mécanismes expliquant ce nouvel effet.

Les questions principales posées au cours de cette thèse sont donc :

- 1) L'exacerbation de la génotoxicité de la colibactine induite par le DON peut-elle être élargie à d'autres génotoxines ?
- 2) Quel est le mode d'action du DON pouvant expliquer ce nouvel effet ?
- 3) D'autres toxines partageant ce mode d'action peuvent-elles reproduire cet effet ?

B. Stratégies utilisées

Pour répondre à ces questions, la première stratégie a été d'utiliser 3 génotoxines « modèles », aux modes d'action bien connus et distincts, en combinaison avec le DON. Ces génotoxines bien décrites et disponibles à l'achat ont permis d'évaluer facilement l'impact du DON sur la génotoxicité, en couvrant les grands types de dommages à l'ADN auxquels l'Homme peut être exposé (**Chapitre I**). Cette stratégie a permis de fournir une preuve de concept, qui a pu être élargie à une génotoxine contaminant l'alimentation (**Chapitre II**), et à une seconde génotoxine bactérienne (**Chapitre III**). Dans le cadre du deuxième objectif, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'inhibition du ribosome induite par le DON était à l'origine de ce nouvel effet. Une forme atténuée du DON a donc été testée en interaction avec plusieurs génotoxines (**Chapitre I**).

Enfin, pour incriminer définitivement l'inhibition du ribosome dans ce nouvel effet et répondre à la 3^{ème} question, différentes ribotoxines de l'exposome, qu'elles aient un mode d'action similaire (**Chapitres I et II**) ou différent (**Chapitre III**) du DON ont été testées en interaction avec des génotoxines modèles, alimentaires ou bactériennes.

1. Modèles cellulaires et doses d'exposition

L'intestin est le premier organe exposé aux xénobiotiques alimentaires, et constitue donc la première barrière lors de l'exposition aux toxines. Ainsi, les études menées durant cette thèse ont majoritairement mis en œuvre des cellules intestinales. Pour étudier l'effet des mélanges entre ribotoxines et génotoxines, les lignées intestinales épithéliales murine (IEC-6) et humaine (HT-29) ont été sélectionnées. Les cellules IEC-6 sont des cellules non cancéreuses et non transformées, ce qui en fait un modèle se rapprochant de la physiologie digestive. La lignée HT-29 est une lignée couramment utilisée en toxicologie, qui a permis de confirmer que les résultats obtenus dans des cellules murines sont applicables à une lignée intestinale humaine. Les études *in vitro* menées pendant cette thèse, reproductibles, rapides et moins onéreuses que des études *in vivo*, ont permis de tester de nombreuses combinaisons de mélanges, et ainsi de déterminer les doses effectives minimales, tout en limitant les expérimentations animales dans le respect des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Pour la détermination des doses à tester, les NOAEL, LOAEL ou BMDL de référence disponibles dans la littérature ont été converties en doses d'exposition au niveau intestinal (**Chapitres I et II**). Ainsi, les doses utilisées dans ces études peuvent raisonnablement être comparées aux valeurs toxicologiques de référence, pour estimer l'applicabilité des données obtenues à une exposition alimentaire réelle.

2. Détection des dommages à l'ADN

Pour l'évaluation et la quantification de la génotoxicité, le marqueur γ H2AX, bien décrit dans la littérature, a été utilisé. H2AX est un variant d'histone présent chez presque tous les eucaryotes, qui joue un rôle fondamental dans la DDR. En réponse aux dommages à l'ADN, et notamment à la formation de DSB, H2AX est phosphorylée par les kinases senseurs de la DDR (famille des phosphoinositide 3-kinases (PIKKs)), notamment la kinase ATM (*Ataxia Teleangiectasia Mutated*). La forme phosphorylée d'H2AX, alors appelée γ H2AX, est impliquée dans le recrutement de nombreuses autres protéines de la DDR (Podhorecka *et al.*, 2010). γ H2AX est couramment utilisée comme marqueur de génotoxicité, notamment pour sa forte sensibilité qui permet de détecter de très subtiles modifications dans l'intégrité du génome.

Le marqueur γ H2AX est également très adapté à la méthode l'In Cell Western (**figure 12**), principale méthode utilisée dans cette thèse, notamment grâce à des phénomènes d'auto-amplification (phosphorylation consécutive de nombreux histones H2AX flanquant la DSB).

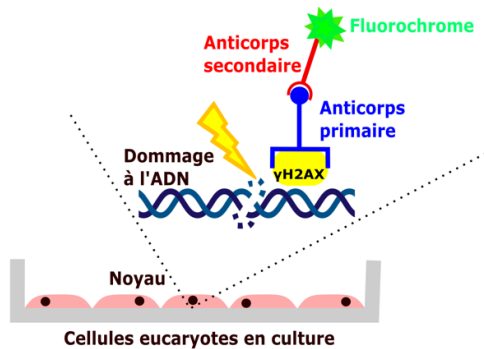


Figure 12 : Principe de l'In-Cell Western. Un anticorps primaire spécifique de γ H2AX est hybridé directement sur des cellules en culture, puis repéré à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome.

L'In-Cell Western présente de nombreux avantages par rapport au Western blot traditionnel. Notamment, comme les anticorps sont utilisés directement sur les cellules en microplaques 96 puits, le débit de l'analyse est considérablement augmenté. Cela permet de cribler de nombreuses doses de toxines, et plusieurs mélanges en parallèle. En revanche, cette technique doit être complétée par des analyses microscopiques. En effet, l'In-Cell Western mesure les niveaux d'ADN présents dans chaque puits (marquage au RedDot2). Cette donnée permet d'exclure une cytotoxicité massive (décollement cellulaire), mais n'exclut pas les mortalités plus précoces (cellules apoptotiques, qui expriment de hauts niveaux de γ H2AX associés à la mort cellulaire et non aux phénomènes d'intérêt). Dans ce travail, la détection de γ H2AX par In-Cell Western a donc systématiquement été complétée et confirmée par la détection d'autres protéines de la DDR (53BP1 et pRPA32) (**figure 13**) par immunofluorescence, et par l'analyse de l'état structural des noyaux colorés au DAPI.

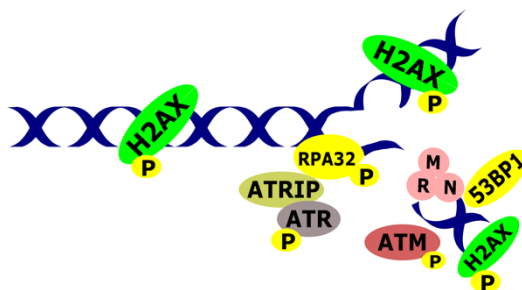


Figure 13 : Schéma simplifié des protéines de la réponse aux dommages à l'ADN.

ETUDES EXPERIMENTALES

Chapitre I

Le DON exacerbe-t-il la génotoxicité induite par des génotoxines aux modes d'action différents de la colibactine ?

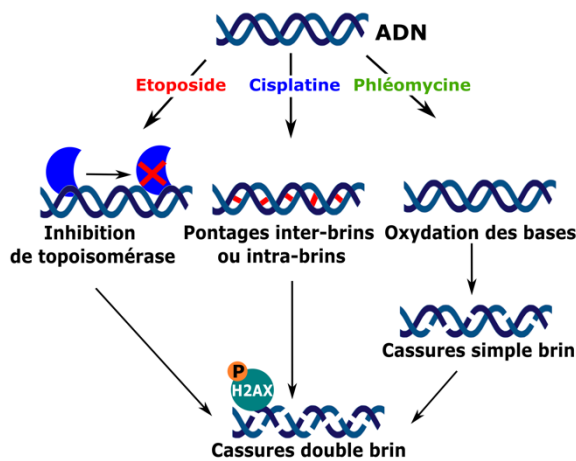


Figure 14 : Différents types de dommages à l'ADN induits par les génotoxines utilisées dans l'étude.

Outre la colibactine, de nombreux composés qui induisent des dommages à l'ADN de différents types font partie de l'exposome. Nous nous sommes donc interrogés sur la spécificité de ce nouvel effet du DON sur la génotoxicité de la colibactine. Cette première étude a utilisé des génotoxines « modèles » aux modes d'actions distincts (**figure 14**), pour démontrer que le DON exacerbe plusieurs types de dommages à l'ADN. Cet article a également suggéré un rôle de la ribotoxicité induite par le DON dans ce nouvel effet, au travers de l'utilisation du

deepoxy-deoxynivalenol (DOM-1), forme atténuée du DON qui n'inhibe plus la fonction ribosomale, et d'inhibiteurs du ribosome aux modes d'action distincts (**figure 15**).

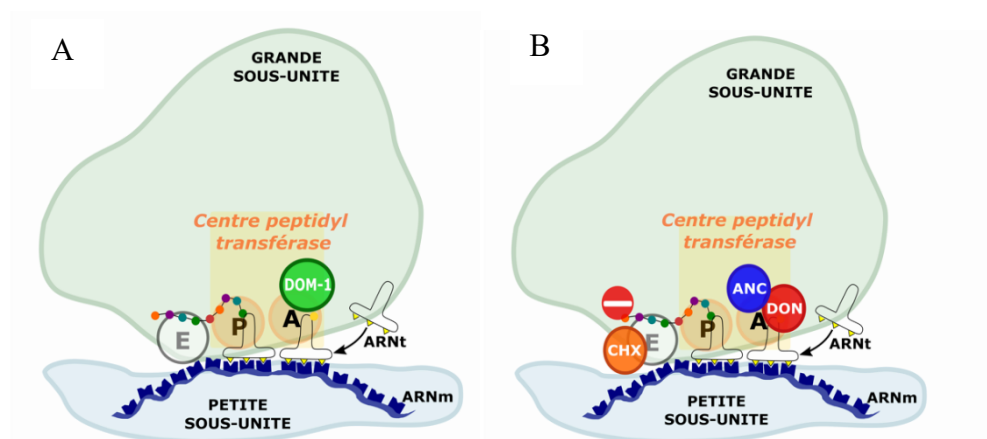


Figure 15 : Fixation du DOM-1 (A), du DON, cycloheximide (CHX) et de l'anisomycine (ANC) (B) au niveau du ribosome eucaryote.

Cet article a été publié dans *Science of the Total Environment* en janvier 2022.



The foodborne contaminant deoxynivalenol exacerbates DNA damage caused by a broad spectrum of genotoxic agents



Marion Garofalo ^{a,b}, Delphine Payros ^b, Eric Oswald ^{b,c}, Jean-Philippe Nougayrède ^{b,*}, Isabelle P. Oswald ^{a,*}

^a Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

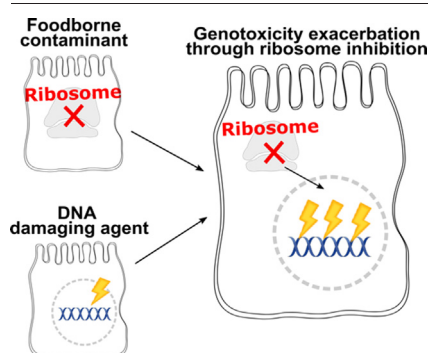
^b IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRAE, ENVT, UPS, Toulouse, France

^c CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service de Bactériologie-Hygiène, Toulouse, France

HIGHLIGHTS

- Consumer can be exposed to multiple contaminants.
- DON exacerbates different types of DNA damage on intestinal epithelial cells.
- Exacerbation of DNA damage is related to the ribotoxicity of DON.
- Co-exposure to DON and genotoxic compounds could have a role in colorectal cancer.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 October 2021

Received in revised form 14 January 2022

Accepted 16 January 2022

Available online 20 January 2022

Editor: Henner Hollert

Keywords:

Contaminant

Mycotoxins

DON

DNA damage

Genotoxicity

ABSTRACT

Humans are exposed to different contaminants including mycotoxins. Deoxynivalenol (DON), a potent ribosome inhibitor, is a highly prevalent mycotoxin in the food chain worldwide. Although DON is not genotoxic, we previously showed that it exacerbates the genotoxicity of colibactin, a DNA-crosslinking toxin produced by bacteria in the gut. In the present study, we investigated whether this phenotype can be extended to other genotoxic compounds with different modes of action. Our data showed that, at a dose that can be found in food, DON exacerbated the DNA damage caused by etoposide, cisplatin and phleomycin. In contrast, de-epoxy-deoxynivalenol (DOM-1), a modified form of DON that does not induce ribotoxic stress, did not exacerbate DNA damage. The effect of DON was mimicked with other ribosome inhibitors such as anisomycin and cycloheximide, suggesting that ribotoxicity plays a key role in exacerbating DNA damage. In conclusion, a new effect of DON was identified, this toxin aggravates the DNA damage induced by a broad spectrum of genotoxic agents with different modes of action. These results are of utmost importance as our food can be co-contaminated with DON and DNA-damaging agents.

1. Introduction

Humans are exposed to a broad spectrum of food-contaminants, including mycotoxins (Payros et al., 2021a). These toxins produced by fungi are

the most common naturally occurring food contaminants and global surveys have estimated that they contaminate up to 70% of world crop production (Streit et al., 2013; Eskola et al., 2020). Mycotoxins can persist during food processing and are thus found in the consumer's meals (Sugita-Konishi et al., 2006).

Deoxynivalenol (DON) is a widespread mycotoxin in food. A recent survey by the European Food Safety Authority (EFSA) reported that almost 50% of cereals are contaminated by this toxin; the highest levels being

* Corresponding authors.

E-mail addresses: jean-philippe.nougayrede@inrae.fr (J.-P. Nougayrède), isabelle.oswald@inrae.fr (I.P. Oswald).

measured in wheat, maize, and oat grains (Knutsen et al., 2017). Recent assessments using urinary levels as a biomarker, revealed that around 80% of individuals are exposed to DON (Turner et al., 2008; De Santis et al., 2019). Based on its toxicity, a tolerable daily intake (TDI) of 1 µg DON/kg body weight/day has been defined by JEFCA and EFSA (JEFCA, 2011; Knutsen et al., 2017). However, this TDI can be exceeded in some population groups, especially in children (Knutsen et al., 2017; Vin et al., 2020).

Acute exposure to DON is associated with vomiting and bloody diarrhea (Ruan et al., 2020) while chronic exposure decreases food consumption, induces neuro-endocrine changes, and alters immune functions (Maresca, 2013; Pinton et al., 2015; Robert et al., 2017; Terziolo et al., 2018). Upon ingestion of contaminated food, intestinal epithelial cells are the first target of DON (Maresca, 2013; Pinton and Oswald, 2014; Graziani et al., 2015). Its toxicity arises from its capacity to bind and inhibit the peptidyl transferase center in the 60S subunit of the ribosome (Garreau de Loubresse et al., 2014; Pierron et al., 2016a). This results in the inactivation of protein synthesis and a “ribotoxic stress response”, which leads to the activation of MAP kinases and their downstream pathways including inflammatory response and oxidative stress (Pestka, 2008; Mishra et al., 2014; Luciole et al., 2013; Da Silva et al., 2018; Payros et al., 2016). DON alters intestinal epithelium morphology, impairs the barrier function and nutrient absorption (Ghareeb et al., 2014; Pierron et al., 2016b; Pinton et al., 2009), modifies intestinal microbiota (Waché et al., 2009), triggers intestinal inflammation (Maresca et al., 2008; García et al., 2018; Pestka, 2010) and increases susceptibility to intestinal inflammatory diseases (Payros et al., 2020, 2021b).

DON is not genotoxic and is not classified as carcinogenic by the International Agency for Research on Cancer (IARC) (International Agency for Research on Cancer, 1993). However, we previously showed that DON exacerbates DNA damage, characterized by the phosphorylation of the histone H2AX (γH2AX) induced by colibactin, an *Escherichia coli* genotoxin produced mainly in the intestine, and suspected of being involved in colorectal cancer (Nougayrede et al., 2006; Payros et al., 2017; Pleguezuelos-Manzano et al., 2020; Lopez et al., 2021). The aim of the present study was to investigate if realistic doses of DON exacerbate the genotoxicity caused by different DNA damaging agents, and if exacerbation is linked to its ribotoxicity.

2. Methods

2.1. Toxins and reagents

DON, etoposide, cisplatin, anisomycin and cycloheximide were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), and phleomycin (closely related to bleomycin) from Invivogen (Toulouse, France). DOM-1, a kind gift from G. Schatzmayr and D. Moll, was obtained by transforming crystalline DON (Romer Labs, Tulln, Austria) as previously described (Pierron et al., 2016a). Stock solutions were stored at -20°C ; etoposide (5 mM), phleomycin (13.78 mM), DON (5 mM), DOM-1 (5 mM) and anisomycin (75 µM) were dissolved in DMSO; cisplatin (1.5 mM) and cycloheximide (18 mM) were dissolved in water.

2.2. Cell treatments

Non-transformed rat intestinal epithelial cells (IEC-6, ATCC CRL-1592) were cultured in complete DMEM GlutaMAX™ medium (Fisher Scientific) supplemented with 10% fetal calf serum, 1% non-essential amino acids (Fisher Scientific) and 0.1 U/mL bovine insulin (Sigma-Aldrich), at 37°C with 5% CO_2 . Human colon adenocarcinoma cells (HT-29) were cultured in complete McCoy's 5a Modified medium (Fisher Scientific) supplemented with 10% fetal calf serum and 1% non-essential amino acids (Fisher Scientific), at 37°C with 5% CO_2 . Cells were seeded in black 96-well plates (Greiner bio-one, Les Ulis, France) or Labtech (Fisher Scientific) and grown for 24–48 h to reach ~80% confluence before treatment. Cells were washed three times with warm HBSS before treatment. Cells were incubated for 4 h at 37°C with 5% CO_2 in DMEM Hepes medium (Fisher Scientific)

containing different concentrations of genotoxins (1 to 5 µM etoposide, 15 to 25 µM cisplatin, or 1 to 5 µM phleomycin) and ribotoxins. Control cells were treated with DMSO vehicle (Sigma-Aldrich). After treatment, cells were washed three times with cold PBS and fixed with 4% formaldehyde (Fisher Scientific) for 20 min at room temperature before In-Cell Western or immunofluorescence assays.

2.3. Immunofluorescence staining

After fixation, cells were permeabilized for 15 min with PBS 0.25% Triton X-100 and blocked for 1 h in blocking solution (PBS 5% normal goat serum 0.01% Tween 20). Cells were incubated with monoclonal primary antibody anti γH2AX diluted 1:500 (mouse monoclonal clone JBW301, Millipore, Burlington, USA) and anti S33-pRPA32 diluted 1:500 (rabbit polyclonal, Bethyl, Montgomery, USA) in blocking solution, for 3.5 h at room temperature. Following washing in PBS 0.05% Triton X-100, cells were incubated for 2 h in the dark at room temperature with anti-mouse AlexaFluor 488 and anti-rabbit AlexaFluor 568 (Invitrogen, Waltham) diluted 1:1000. After three washes with PBS, Labtech were mounted using Fluoroshield containing DAPI (Sigma-Aldrich) and examined with a Zeiss LSM 710 confocal microscope.

2.4. Quantification of DNA damage by In-Cell Western analysis

Quantification of γH2AX by In-Cell Western analysis was performed as previously described (Martin et al., 2013; Theumer et al., 2018). Briefly, the fixed cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 and incubated in Maxblock (Active Motif) before immuno-staining with rabbit monoclonal anti-γH2AX diluted 1:200 (20E3; Cell Signaling, Saint-Quentin en Yvelines, France) followed by near-infrared-fluorescent secondary antibody diluted 1:500 (IRDye 800CW; Rockland) and staining of DNA with RedDot2 diluted 1:1000 (Biotium, Interchim, Montluçon, France). The DNA and γH2AX signals were measured at 680 and 800 nm with an Odyssey infrared imaging scanner (LI-COR Science Tec, Les Ulis, France). The genotoxic index was calculated by dividing the γH2AX fluorescence by the corresponding DNA fluorescence and normalized with the average fluorescence in untreated control cells (Tronnet and Oswald, 2018). All the data from three biological replicates are presented.

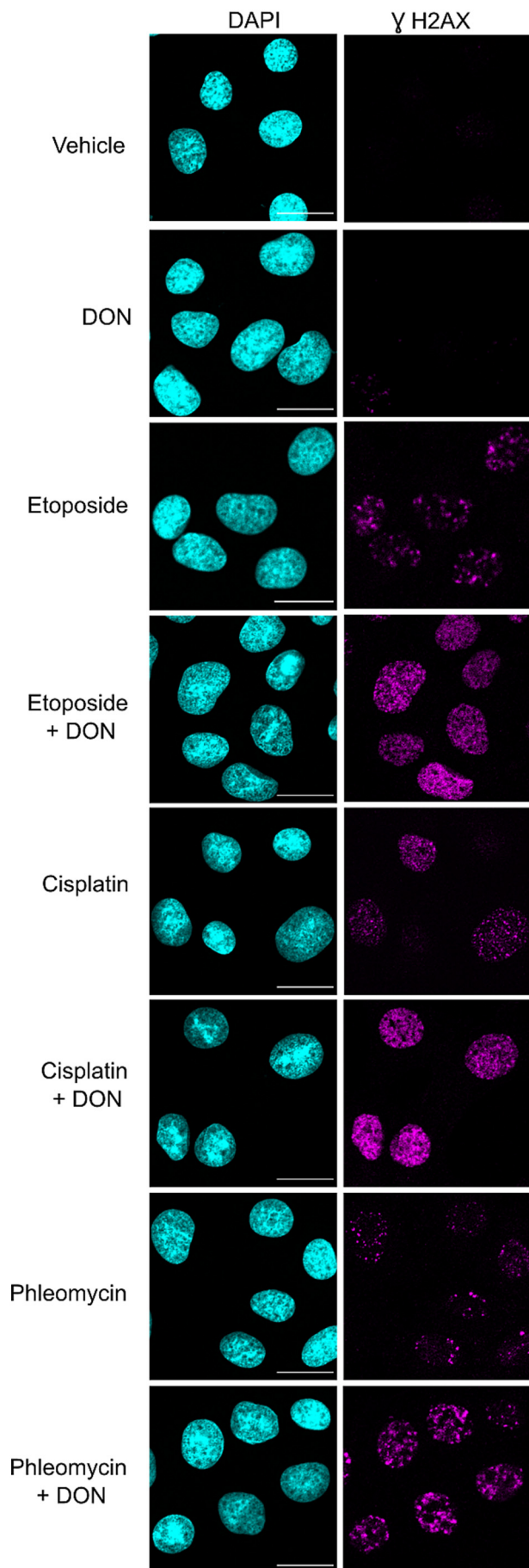
2.5. Statistical analyses

P-values were calculated using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison using GraphPad Prism 7.0. For In-Cell Western analyses, the data are expressed as mean \pm SEM.

3. Results

3.1. DON exacerbates the genotoxicity caused by etoposide, cisplatin and phleomycin

To assess whether DON modifies the toxicity of a variety of genotoxins, cultured cells were treated with DON combined with one of the three DNA-damaging compounds with different modes of action: etoposide (ETP), a topoisomerase inhibitor, which causes DNA double strand breaks (Hande, 1998); cisplatin (CPT), which causes DNA adducts and crosslinks (Dasari and Tchounwou, 2014); phleomycin (PHM), which causes oxidation of bases and single strand breaks (Chen and Stubbe, 2005). More precisely, non-transformed rat intestinal epithelial IEC-6 cells were treated for 4 h with 3 µM ETP, 20 µM CPT or 3 µM PHM, alone or combined with 10 µM DON or 10 µM DMSO used as control (vehicle). DNA damage was visualized using immunofluorescence confocal microscopy of phosphorylated H2AX (called γH2AX), a robust and quantitative DNA damage marker (Rogakou et al., 1998). Control cells and cells treated only with DON exhibited low basal levels of γH2AX in nuclei (Fig. 1). Treatment with the different genotoxins led to an increase in γH2AX staining whereas cells treated with both DON and the genotoxins exhibited exacerbated γH2AX signals



(Fig. 1). Increased γ H2AX staining was also observed in human colon cancer HT-29 cells treated with DON and the genotoxins (Fig. S1).

To confirm that treatment with DON increased DNA damage caused by the genotoxins, a second DNA damage marker, phosphorylated RPA32 (pRPA32), which is phosphorylated in response to genotoxic stress (Dueva and Iliakis, 2020), was examined. Cotreatment with DON and the genotoxins also increased the levels of pRPA32 compared to the genotoxins alone (Fig. S2). In conclusion, DON exacerbates the DNA damage caused by a variety of DNA-damaging compounds with different modes of action.

3.2. DON induces dose-dependent exacerbation of the DNA damage caused by a variety of genotoxins

To quantify the exacerbation of DNA damage caused by the mycotoxin, IEC-6 cells were treated with varying doses of the three genotoxins together with 10 μ M DON, then γ H2AX levels in the cell population were measured by In-Cell Western assay. DNA damage increased when the dose of etoposide was increased from 1 μ M to 5 μ M. Additionally, for each dose of etoposide, cotreatment with 10 μ M DON markedly exacerbated DNA damage. Similarly, DNA damage caused by cisplatin and phleomycin increased with an increase in the dose of genotoxin and were significantly exacerbated at a dose of 10 μ M DON (Fig. 2).

To assess whether DON at realistic doses could exacerbate the DNA damage caused by the different genotoxins, the cells were treated with single doses of DNA-damaging compounds combined with DON at doses ranging from 0.3 μ M to 10 μ M. DNA damage exacerbation increased with an increase in the dose of DON from 1 μ M DON for cisplatin and phleomycin, and from 3 μ M DON for etoposide (Figs. 3, S3). DON exacerbation of DNA damage was not associated with cell death assessed by DNA staining and quantification (Table S1), consistent with the normal morphology of DAPI-stained nuclei in the cells treated with both DON and the genotoxins (Fig. 1). Taken together, these results show that DON exacerbates DNA damage caused by different genotoxins at a dose as low as 3 μ M.

3.3. De-epoxy-deoxynivalenol (DOM-1) does not exacerbate the DNA damage caused by the different genotoxins

To probe the mechanism by which DON exacerbates the DNA damage, we investigated if ribosome inhibition was implicated. Cells were treated with de-epoxy-deoxynivalenol (DOM-1), a detoxified form of DON that binds to but does not inhibit the ribosome (Pierron et al., 2016a). In contrast to cells treated with the genotoxins and DON, γ H2AX levels were similar in cells treated with the genotoxins alone or combined with 10 μ M DOM-1 (Fig. 4). DOM-1 and/or the genotoxins did not result in cell death (Table S1). Thus, non-ribotoxic DOM-1 does not exacerbate the DNA damage caused by different genotoxic compounds.

3.4. The ribosome inhibitors anisomycin and cycloheximide exacerbate the DNA damage caused by the different genotoxins

To confirm the role of ribosome inhibition in exacerbating DNA damage, the capacity of two ribosome inhibitors with distinct targets to exacerbate DNA damage was tested. Cells were treated with anisomycin, which, like DON, inhibits the A site of the ribosome, or with cycloheximide, which binds to the E site and interferes in the translocation step of protein synthesis (Schneider-Poetsch et al., 2010). Both inhibitors significantly increased the DNA damage in the

Fig. 1. DON exacerbates phosphorylation of H2AX caused by etoposide, cisplatin and phleomycin. Non-transformed rat intestinal epithelial IEC-6 cells were treated for 4 h with 10 μ M DON or 10 μ M DMSO vehicle combined with 3 μ M ETP, 20 μ M CPT or 3 μ M PHM, and γ H2AX was examined by immunofluorescence. Representative photos. Scale bar = 20 μ m.

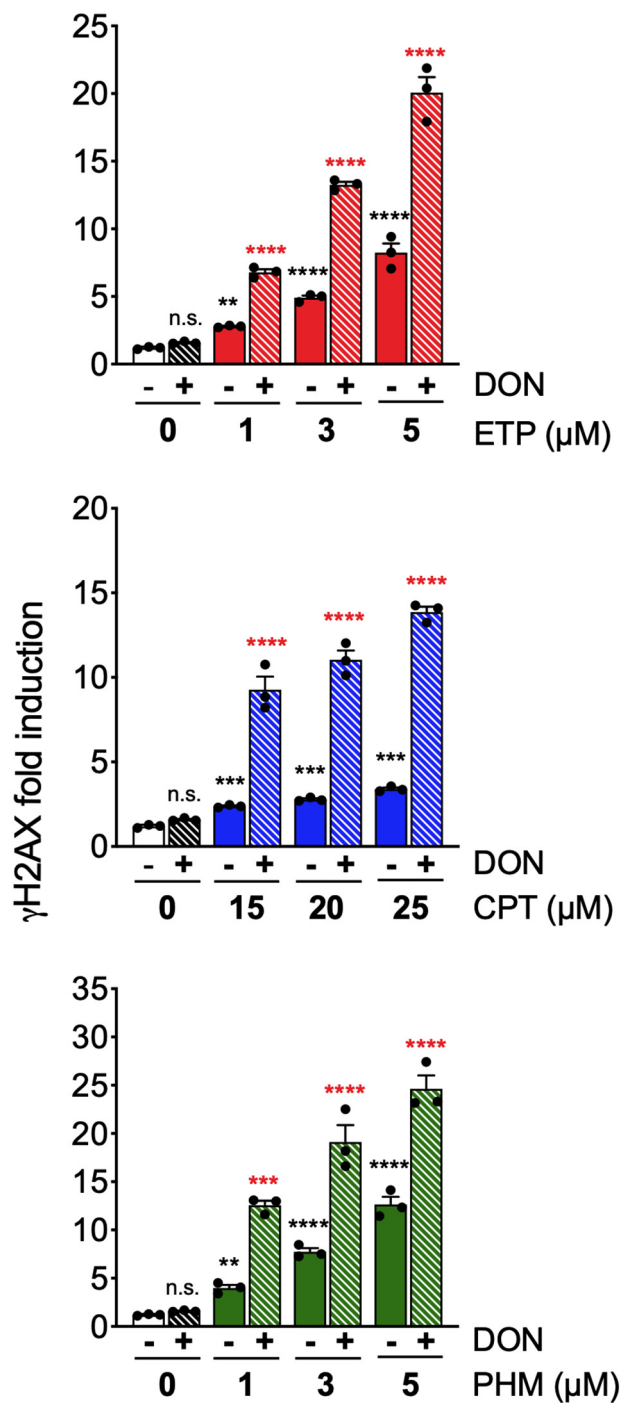


Fig. 2. Dose-dependent genotoxicity of etoposide, cisplatin and phleomycin and its exacerbation by DON. Non-transformed rat intestinal epithelial IEC-6 cells were treated for 4 h with 10 µM DON or 10 µM DMSO vehicle combined with different doses of ETP (red), CPT (blue) or PHM (green), then H2AX phosphorylation levels were quantified by In-Cell Western. All the data are expressed as mean ± SEM (3 independent experiments). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison. Values that differ significantly from vehicle are indicated by black asterisks, and values that differ significantly from the genotoxin alone are indicated by red asterisks. n.s.: not significant, **: P < 0.01, ***: P < 0.001, ****: P < 0.0001.

cells cotreated with etoposide, cisplatin or phleomycin, in a similar way to DON without causing cell death (Fig. 5, Table S1). Altogether, these results indicate that the ribotoxicity induced by DON does exacerbate DNA damage.

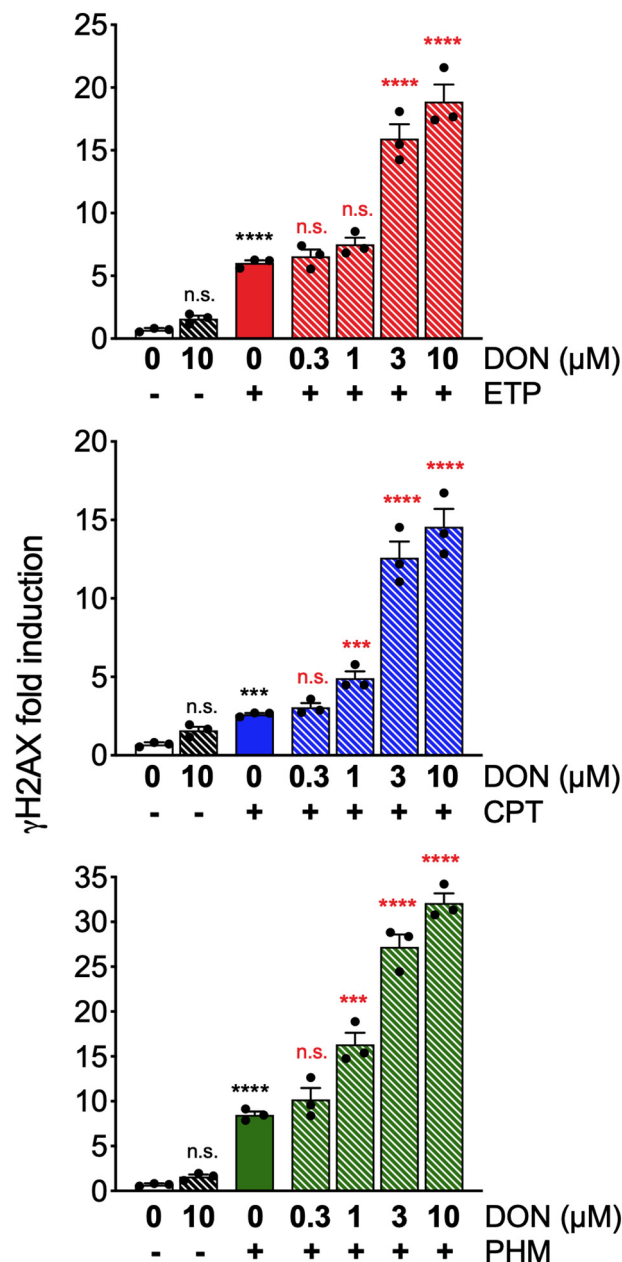


Fig. 3. DON exacerbates genotoxicity caused by etoposide, cisplatin and phleomycin in a dose-dependent manner. Non-transformed rat intestinal epithelial IEC-6 cells were treated for 4 h with the doses of DON shown in the figure, combined with 5 µM ETP (red), 25 µM CPT (blue) or 5 µM PHM (green), then H2AX phosphorylation levels measured in three independent experiments were quantified by In-Cell Western analysis. All the data are expressed as mean ± SEM (3 independent experiments). All P-values are calculated using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison. Values that differ significantly from the vehicle are indicated by black asterisks, and values that differ significantly from the genotoxin alone are indicated by red asterisks. ***: P < 0.001, ****: P < 0.0001, n.s.: not significant.

4. Discussion

Given its intrinsic toxicity and prevalence, DON is a major concern for food safety (Knutsen et al., 2017; Payros et al., 2016). The toxicity of DON is well documented, but little is known about its interactions with other toxins (Allassane-Kpembi et al., 2017; Luo et al., 2019). We recently observed that DON increases genotoxicity induced by colibactin, a bacterial toxin that causes peculiar DNA-interstrand crosslink lesions

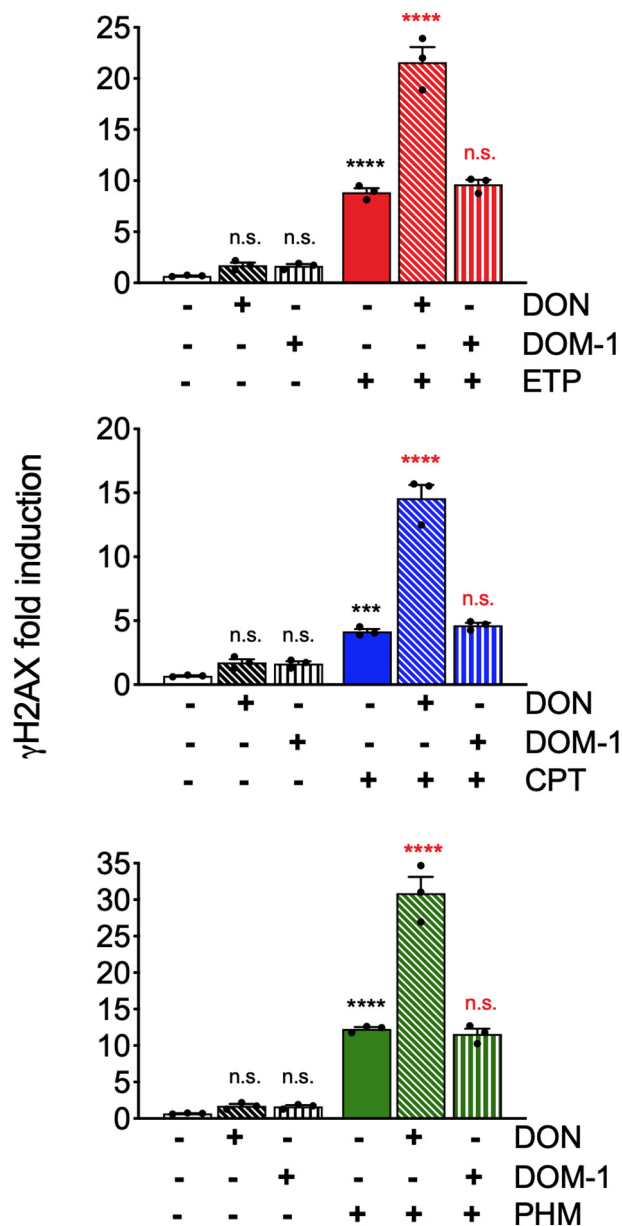


Fig. 4. DOM-1 does not exacerbate genotoxicity caused by etoposide, cisplatin and phleomycin. Non-transformed rat intestinal epithelial IEC-6 cells were treated for 4 h with 10 μ M DON or DOM-1 and 5 μ M ETP (red), 20 μ M CPT (blue), or 5 μ M PHM (green), then H2AX phosphorylation levels measured in three independent experiments were quantified by In-Cell Western analysis. All the data are expressed as mean \pm SEM (3 independent experiments). All P values are calculated using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison. Values that differ significantly from the vehicle are indicated by black asterisks, and values that differ significantly from the genotoxin alone are indicated by red asterisks. ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$, n.s: not significant.

(Payros et al., 2017; Bossuet-Greif et al., 2018; Xue et al., 2019). The aim of the present study was to determine whether this phenotype extends to other genotoxins with other modes of action, and, if so, to investigate the mechanism involved. We observed that DON also exacerbates the genotoxicity of three well-known drugs: etoposide, phleomycin and cisplatin, that respectively induce DNA double strand breaks, single strand breaks, and adducts (Smart et al., 2008; Povirk, 1996; Siddik, 2003). Thus, although DON is not inherently genotoxic, it exacerbates DNA damage caused by a broad spectrum of genotoxic agents.

The exacerbation of DNA damage caused by DON has been linked to its ribotoxicity. Indeed, the non-ribotoxic DON derivative DOM-1 (Pierron et al., 2016a) did not exacerbate genotoxicity. Conversely, ribotoxins with modes of action similar to or distinct from that of DON (anisomycin and cycloheximide respectively) reproduced the DNA damage exacerbating phenotype, suggesting that the ribosome inhibitor mode of action is not critical for DNA damage exacerbation. The mechanism by which DON and other ribotoxins aggravate the genotoxicity of various genotoxins remains to be identified but several hypotheses can be proposed. First, ribosomes play an important role in genome preservation through ribosomal proteins that have a direct role in DNA repair (Mao-De and Jing, 2006). In addition, upon genotoxic stress, the cell reprograms mRNA translation to quickly synthesize proteins involved in the stress response (Kabilan et al., 2020; Spriggs et al., 2010). Thus, DON interference with ribosome function could increase DNA damage by disturbing DNA damage response. Second, ribotoxins such as DON and anisomycin trigger the "ribotoxic stress response" with the recruitment of its main mediator, the protein kinase R (PKR) (Zhou et al., 2014). Activated PKR has been reported to interact functionally with DNA repair proteins, to repress the repair response, and to sensitize the cells to DNA damaging agents (Bennett et al., 2006; Zhang et al., 2004). Third, DON and ribotoxins have been reported to cause upregulation of inflammatory cytokines such as interleukins or IFN γ , and expression of transcription factors such as NF- κ B (Pestka, 2010; Cano et al., 2013; Luo et al., 2021). It is known that inflammation negatively regulates the DNA repair machinery (Jaiswal et al., 2000). For example, some studies reported that over-expression of NF- κ B triggers the shutdown of tumor suppressor p53 activity, which plays an important role in DNA repair systems (Hudson et al., 1999; Gudkov et al., 2011). Thus, ribotoxin-induced inflammatory response could sensitize the cells to DNA damage by influencing cell response to DNA damage. Additional studies are needed to explore these hypotheses.

Exacerbation of genotoxicity was observed from a dose as low as 1 μ M of DON. This result is biologically pertinent given the concentrations of DON to which consumers are exposed. Indeed, DON concentrations of 0.16–2 μ g/mL (0.5–7 μ M) can be considered as realistic in the human gut (Sergent et al., 2006; Maresca, 2013). The lower concentration corresponds to prolonged daily intake by consumers and the higher one corresponds to the level that can be reached after consumption of heavily contaminated food (Knutzen et al., 2017; Vin et al., 2020; Alassane-Kpembé et al., 2013). Consequently, the level of DON to which humans are exposed could potentiate the genotoxicity of foodborne genotoxins. Humans are exposed to many naturally occurring dietary genotoxins, or that are produced during food processing (Sakita et al., 2017; Goldman and Shields, 2003). These genotoxins can cause different forms of DNA damage such as single or double strand breaks and adducts (Barnes et al., 2018). For example, a daily intake of 26 ng/kg body weight of heterocyclic amines, which are formed during cooking and cause DNA strand breaks and adducts, has been described in the US population (Layton et al., 1995). Similarly, European are exposed to 2 μ g/kg body weight of the DNA strand break-inducing heavy metal cadmium (European Food Safety Authority, 2012).

Given the high prevalence of DON in human food, one can assume that intestinal epithelial cells are co-exposed to this mycotoxin together with dietary genotoxins. The present study demonstrates that realistic doses of DON exacerbate DNA damage induced by various type of genotoxic drugs (etoposide, cisplatin and phleomycin) and preliminary results in our laboratory indicate that DON aggravated DNA damage in intestinal cells exposed to dietary genotoxins such as pesticide or alcohol-derived compounds. DNA damage is pivotal in cancer, because it can lead to gene mutations, chromosomal instability and ultimately, cell transformation and neoplasia (Jackson and Bartek, 2009). We therefore suggest that DON could enhance the carcinogenic potential of intestinal mutagens. In 1993, IARC concluded that DON cannot be classified with respect to its carcinogenicity for humans (International Agency for Research on Cancer, 1993; Claeys et al., 2020). However, a preliminary report on a large-scale epidemiological study including

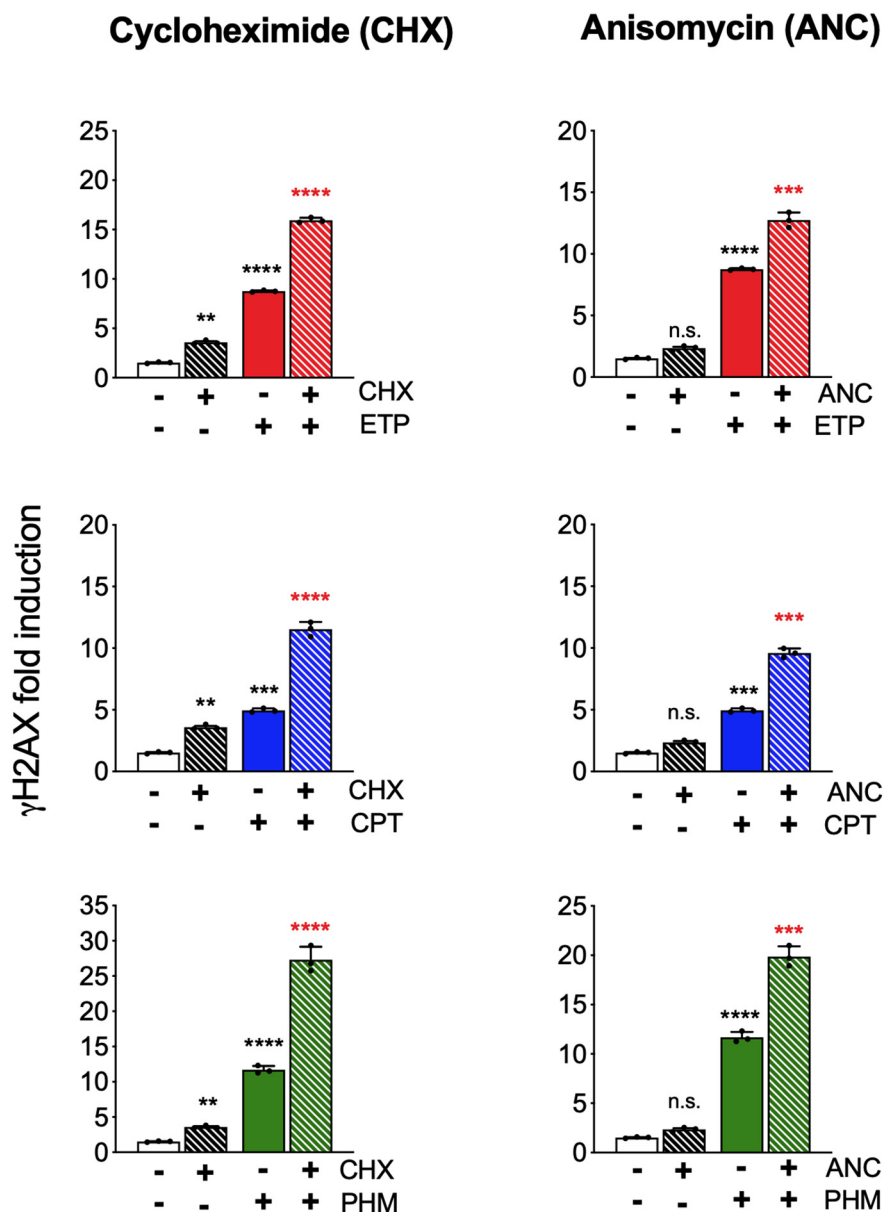


Fig. 5. Cycloheximide and anisomycin exacerbate genotoxicity caused by etoposide, cisplatin and phleomycin. Non-transformed rat intestinal epithelial IEC-6 cells were treated for 4 h with 1 μ M CHX or 100 pM ANC combined with 5 μ M ETP (red), 20 μ M CPT (blue) or 5 μ M PHM (green), then H2AX phosphorylation measured in three independent experiments was quantified by In-Cell Western analysis. All the data are expressed as mean \pm SEM (3 independent experiments). All P-values are calculated using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison. Values that differ significantly from the vehicle are indicated by black asterisks, and values that differ significantly from the genotoxin alone are indicated by red asterisks. **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$, n.s.: not significant.

half a million participants from 10 European countries followed for 15 years points to an association between the risk of proximal colon cancer and long-term exposure to DON (Huybrechts et al., 2019). Further studies are needed to examine whether exposure to DON (and other ribosome inhibitors) could promote cancer by exacerbating the genotoxicity of endogenous and dietary mutagens.

CRediT authorship contribution statement

Marion Garofalo: design experiments, experiments, data analysis, writing - original draft preparation. Delphine Payros: data analysis, writing, reviewing. Eric Oswald: reviewing. Jean-Philippe Nougayrède: funding acquisition, study design, writing, reviewing, editing. Isabelle Oswald: funding acquisition, study design, writing, reviewing, editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We thank Simon Lachambre and Sophie Allart for technical assistance at the cellular imaging facility of Inserm UMR 1291, Toulouse. We thank G. Schatzmayr and D. Moll from the BIOMIN Research Center in Tulln (Austria) for the DOM-1 product. We thank Julien Vignard (Toxalim) for his scientific input. We are grateful to Daphne Goodfellow for editing the language. This work was supported by a grant from the French Agence Nationale de la Recherche (Genofood ANR-19-CE34-0014). M. Garofalo

was supported by a fellowship from the French Ministry of Higher Education and Research.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153280>.

References

- Alassane-Kpembé, I., Kolf-Clauw, M., Gauthier, T., Abrami, R., Abiola, F.A., Oswald, I.P., Puel, O., 2013. New insights into mycotoxin mixtures: the toxicity of low doses of type B trichothecenes on intestinal epithelial cells is synergistic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.05.023>.
- Alassane-Kpembé, I., Puel, O., Pinton, P., Cossalter, A.M., Chou, T.C., Oswald, I.P., 2017. Co-exposure to low doses of the food contaminants deoxynivalenol and nivalenol has a synergistic inflammatory effect on intestinal explants. *Arch. Toxicol.* 91, 2677–2687. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1902-9>.
- Barnes, J.L., Zebair, M., John, K., Poirier, M.C., Marin, F.L., 2018. Carcinogens and DNA damage. *Biochem. Soc. Trans.* 46, 1213–1224. <https://doi.org/10.1042/BST20180519>.
- Bennett, R.L., Blalock, W.L., Abtahi, D.M., Pan, Y., Moyer, S.A., Stratford May, W., 2006. RAX, the PKR activator, sensitizes cells to inflammatory cytokines, serum withdrawal, chemotherapy, and viral infection. *Blood* 108, 821–829. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-006817>.
- Bossuet-Greif, N., Vignard, J., Taieb, F., Mirey, G., Dubois, D., Petit, C., Oswald, E., Nougayrède, J.-P., 2018. The colibactin genotoxin generates DNA interstrand cross-links in infected cells. *mBio* 9, e02393. <https://doi.org/10.1128/mBio.02393-17>.
- Cano, P.M., Seebboth, J., Meurens, F., Cagnie, J., Abrami, R., Oswald, I.P., Guzylack, Piriou L., 2013. Deoxynivalenol as a new factor in the persistence of intestinal inflammatory diseases: an emerging hypothesis through possible modulation of Th17-mediated response. *PLoS One* 8, e53647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053647>.
- Chen, J., Stubbe, J., 2005. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 5, 102–112. <https://doi.org/10.1038/nrc1547>.
- Claeys, L., Romano, C., De Ruyck, K., Wilson, H., Fervers, B., Korenjak, M., Zavadil, J., Gunter, M.-J., De Saeger, S., De Boevre, M., Huybrechts, I., 2020. Mycotoxin exposure and human cancer risk: a systematic review of epidemiological studies. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 19, 1449–1464. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12567>.
- Da Silva, E.O., Bracarense, A.P.F.L., Oswald, I.P., 2018. Mycotoxins and oxidative stress: where are we? *World Mycotoxin J.* 11, 113–134. <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2267>.
- Dasari, S., Tchounwou, P., 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* 740, 364–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.
- De Santis, B., Debegnach, F., Miano, B., Moretti, G., Sonogo, E., Chiaretti, A., Buonsenso, D., Brera, C., 2019. Determination of deoxynivalenol biomarkers in Italian urine samples. *Toxins* 11, 441. <https://doi.org/10.3390/toxins11080441>.
- Dueva, R., Iliakis, G., 2020. Replication protein A: a multifunctional protein with roles in DNA replication, repair and beyond. *NAR Cancer* 2, zcaa022. <https://doi.org/10.1093/narcan/zcaa022>.
- Eskola, M., Elliott, C.T., Hajslova, J., Steiner, D., Krska, R., 2020. Towards a dietary-exposome assessment of chemicals in food: an update on the chronic health risks for the European consumer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60, 1890–1911. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1612320>.
- European Food Safety Authority, 2012. Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA Journal* 10, 2551–2588. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2551>.
- García, G.R., Payros, D., Pinton, P., Ana, Dogi C., Laffitte, J., Neves, M., Gonzalez Pereyra, M.L., Cavaglieri, L., Oswald, I.P., 2018. Intestinal toxicity of deoxynivalenol is limited by *Lactobacillus rhamnosus* RC007 in pig jejunum explants. *Arch. Toxicol.* 92, 983–993. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2083-x>.
- Garreau de Loubresse, N., Prokhorova, I., Holtkamp, W., Rodnina, V., Yusupova, G., Yusupov, M., 2014. Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome. *Nature* 513, 517–522. <https://doi.org/10.1038/nature13737>.
- Ghareeb, K., Awad, W.A., Böhm, J., Zebeli, Q., 2014. Impacts of the feed contaminant deoxynivalenol on the intestine of monogastric animals: poultry and swine. *J. Appl. Toxicol.* 35, 327–337. <https://doi.org/10.1002/jat.3083>.
- Goldman, R., Shields, P.G., 2003. Food mutagens. *J. Nutr.* 133, 965S–973S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.3.965S>.
- Graziani, F., Pujol, A., Nicoletti, C., Pinton, P., Armand, L., Di Pasquale, E., Oswald, I.P., Perrier, J., Maresca, M., 2015. The food-associated ribotoxin deoxynivalenol modulates inducible NO synthase in human intestinal cell model. *Toxicol. Sci.* 145, 372–382. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv058>.
- Gudkov, A.V., Gurova, K.V., Komarova, E.A., 2011. Inflammation and p53: a tale of two stresses. *Genes Cancer* 2, 503–516. <https://doi.org/10.1177/1947601911409747>.
- Hande, K.R., 1998. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur. J. Cancer* 34, 1514–1521. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(98\)00228-7](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(98)00228-7).
- Hudson, J.D., Shoaibi, M.A., Maestro, R., Carnero, A., Hanon, G.J., Beach, D.H., 1999. A pro-inflammatory cytokine inhibits P53 tumor suppressor activity. *J. Exp. Med.* 190, 1375–1382. <https://doi.org/10.1084/jem.190.10.1375>.
- Huybrechts, K., Claeys, L., Ferrari, P., Altieri, A., Arcella, D., Papadimitriou, C., Casagrande, C., Nicolas, G., Biessy, C., Zavadil, J., Gunter, M., De Saeger, S., De Boevre, M., 2019. Impact of chronic multi-mycotoxin dietary exposure on colorectal and liver cancer risk in Europe. *World Mycotoxin Forum - Book of Abstracts*, p. 70.
- International Agency for Research on Cancer, 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 978-92-832-1256-0, p. 56.
- Jackson, S.P., Bartek, J., 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>.
- Jaiswal, M., Larusso, N.F., Burgart, L.J., Gores, G.J., 2000. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res.* 60, 184–190.
- JEFCA, 2011. Deoxynivalenol. 72nd Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants. *World Health Organisation WHO Food A 978-92-4-166063-1*.
- Kabilan, U., Graber, T.E., Alain, T., Klovov, D., 2020. Ionizing radiation and translation control: a link to radiation hormesis? *Int. J. Mol. Sci.* 21, 6650. <https://doi.org/10.3390/ijms21186650>.
- Knutsen, H.K., Alexander, J., Barregard, L., Bignami, M., Bruschiweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., et al., 2017. Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA J.* 15, e04718. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4718>.
- Layton, D.W., Bogen, K.T., Knize, M.G., Hatch, F.T., Johnson, V.M., Felton, J.S., 1995. Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research. *Carcinogenesis* 16, 39–52. <https://doi.org/10.1093/carcin/16.1.39>.
- Lopez, L.R., Bleich, R.M., Arthur, J.C., 2021. Microbiota effects on carcinogenesis: initiation, promotion, and progression. *Annu. Rev. Med.* 72, 243–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-080719-091604>.
- Lucioli, J., Pinton, P., Callu, P., Laffitte, J., Grosjean, F., Colf Clauw, M., Oswald, I.P., Bracarense, A.P.F.L., 2013. The food contaminant deoxynivalenol activates the mitogen activated protein kinases in the intestine: interest of ex vivo models as an alternative to in vivo experiments. *Toxicol.* 66, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2013.01.024>.
- Luo, S., Terziolo, C., Bracarense, A.P.F.L., Payros, D., Pinton, P., Oswald, I.P., 2019. In vitro and in vivo effects of a mycotoxin, deoxynivalenol, and a trace metal, cadmium, alone or in a mixture on the intestinal barrier. *Environ. Int.* 132, 105082. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105082>.
- Luo, S., Terziolo, C., Neves, M., Puel, S., Naylies, C., Lippi, Y., Pinton, P., Oswald, I.P., 2021. Comparative sensitivity of proliferative and differentiated intestinal epithelial cells to the food contaminant, deoxynivalenol. *Environ. Pollut.* 277, 116818. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116818>.
- Mao-De, L., Jing, X., 2006. Ribosomal proteins and colorectal cancer. *Curr. Genom.* 8, 43–49. <https://doi.org/10.2174/138920207780076938>.
- Maresca, M., Yahi, N., Younés-Sakr, L., Boyron, M., Caporiccio, B., Fantini, J., 2008. Both direct and indirect effects account for the pro-inflammatory activity of enteropathogenic mycotoxins on the human intestinal epithelium: stimulation of interleukin-8 secretion, potentiation of interleukin-1 β effect and increase in the transepithelial passage of commensal bacteria. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 228, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.11.013>.
- Maresca, M., 2013. From the gut to the brain: journey and pathophysiological effects of the food-associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. *Toxins* 5, 784–820. <https://doi.org/10.3390/toxins5040784>.
- Martin, P., Marçq, I., Magistro, G., Penary, M., Garcia, C., Payros, D., Boury, M., Olier, M., Nougayrède, J.P., Audebert, M., Chalut, C., Schubert, S., Oswald, E., 2013. Interplay between siderophores and colibactin genotoxin biosynthetic pathways in *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* 9, e1003437. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003437>.
- Mishra, S., Dwivedi, P.D., Pandey, H.P., Das, M., 2014. Role of oxidative stress in deoxynivalenol induced toxicity. *Food Chem. Toxicol.* 72, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.06.027>.
- Nougayrède, J.P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., Oswald, E., 2006. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 313, 848–851. <https://doi.org/10.1126/science.1127059>.
- Payros, D., Alassane-Kpembé, I., Pierron, A., Loiseau, N., Pinton, P., Oswald, I.P., 2016. Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms. *Arch. Toxicol.* 90, 2931–2957. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1826-4>.
- Payros, D., Dobrindt, U., Martin, P., Secher, T., Bracarense, A.P.F.L., Boury, M., Laffitte, J., Pinton, P., Oswald, E., Oswald, I.P., 2017. The food contaminant deoxynivalenol exacerbates the genotoxicity of gut microbiota. *mBio* 8, e007-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00007-17>.
- Payros, D., Menard, S., Laffitte, J., Neves, M., Tremblay-Franco, M., Luo, S., Fouche, E., Snini, S.P., Theodorou, V., Pinton, P., Oswald, I.P., 2020. The food contaminant, deoxynivalenol, modulates the Thelper/Treg balance and increases inflammatory bowel diseases. *Arch. Toxicol.* 94, 3173–3184. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02817-z>.
- Payros, D., Garofalo, M., Pierron, A., Soler-Vasco, L., Al-Ayoubi, C., Maruo, V.M., Alassane-Kpembé, I., Pinton, P., Oswald, I.P., 2021a. Mycotoxins in human food: a challenge for research. *Cah. Nutr. Diet.* 56, 170–183. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2021.02.001>.
- Payros, D., Alassane-Kpembé, I., Laffitte, J., Lencina, C., Neves, M., Bracarense, A.P.F.L., Pinton, P., Menard, S., Oswald, I.P., 2021b. Dietary exposure to the food contaminant deoxynivalenol triggers colonic breakdown by activating the mitochondrial and the death receptor pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* 65, e2100191. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202100191>.
- Pestka, J.J., 2008. Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis. *Food Addit. Contam.* 25, 1128–1140. <https://doi.org/10.1080/02652030802056626>.
- Pestka, J.J., 2010. Deoxynivalenol-induced proinflammatory gene expression: mechanisms and pathological sequelae. *Toxins* 2, 1300–1317. <https://doi.org/10.3390/toxins2061300>.
- Pierron, A., Mimoun, S., Murate, L.S., Loiseau, N., Lippi, Y., Bracarense, A.P.F.L., Schatzmayr, G., Wei He, J., Zhou, T., Moll, W.D., Oswald, I.P., 2016a. Microbial biotransformation of DON: molecular basis for reduced toxicity. *Sci. Rep.* 6, 29105. <https://doi.org/10.1038/srep29105>.

- Pierron, A., Alassane-Kpembé, I., Oswald, I.P., 2016b. Impact of two mycotoxins deoxynivalenol and fumonisin on pig intestinal health. *Porcine Health Manag.* 2, 21. <https://doi.org/10.1186/s40813-016-0041-2>.
- Pinton, P., Nougayrede, J.P., Del Rio, J.C., Moreno, C., Marin, D.E., Ferrier, L., Bracarense, A.P.F.L., Kolf-Clauw, M., Oswald, I.P., 2009. The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 237, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.003>.
- Pinton, P., Graziani, F., Pujol, A., Nicoletti, C., Paris, O., Ernouf, P., Di Pasquale, E., Perrier, J., Oswald, I.P., Maresca, M., 2015. Deoxynivalenol inhibits the expression by goblet cells of intestinal mucins through a PKR and MAP kinase dependent repression of the resistin-like molecule β . *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 1076–1087. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500005>.
- Pinton, P., Oswald, I.P., 2014. Effect of deoxynivalenol and other type B trichothecenes on the intestine: a review. *Toxins* 6, 1615–1643. <https://doi.org/10.3390/toxins6051615>.
- Pleguezuelos-Manzano, C., Puschhof, J., Rosendahl Huber, A., Van Hoeck, A., Wood, H.M., Nomburg, J., Gurjao, C., Manders, F., Dalmaso, G., Stege, P.B., et al., 2020. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks + *E. coli*. *Nature* 580, 269–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2080-8>.
- Povirk, L.F., 1996. DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mut. Res.* 355, 71–89. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(96\)00023-1](https://doi.org/10.1016/0027-5107(96)00023-1).
- Robert, H., Payros, D., Pinton, P., Theodorou, V., Mercier-Bonin, M., Oswald, I.P., 2017. Impact of mycotoxins on the intestine: are mucus and microbiota new targets? *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* 20, 249–275. <https://doi.org/10.1080/10937404.2017.1326071>.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., Bonner, W.M., 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273, 5858–5868. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>.
- Ruan, F., Gang Chen, J., Chen, L., Tian Lin, X., Zhou, Y., Jing Zhu, K., Tong Guo, Y., Juan Tan, A., 2020. Food poisoning caused by deoxynivalenol at a school in Zhuhai, Guangdong, China, in 2019. *Foodborne Pathog. Dis.* 17, 429–433. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2710>.
- Sakita, J.Y., Gasparotto, B., Britto Garcia, S., Akira Uyemura, S., Kannen, V., 2017. A critical discussion on diet, genomic mutations and repair mechanisms in colon carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* 265, 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.11.020>.
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyley, D.E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W.C., Green, R., Shen, B., O Liu, J., 2010. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat. Chem. Biol.* 6, 209–217. <https://doi.org/10.1038/nchembio.304>.
- Sergent, T., Parys, M., Garsou, S., Pussemier, L., Schneider, Y.J., Larondelle, Y., 2006. Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations. *Toxicol. Lett.* 164, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.12.006>.
- Siddik, Z.H., 2003. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22, 7265–7279. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206933>.
- Smart, D.J., Halicka, H.D., Schmuck, G., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., Williams, G.M., 2008. Assessment of DNA double-strand breaks and γ H2AX induced by the topoisomerase II poisons etoposide and mitoxantrone. *Mutat. Res.* 641, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.03.005>.
- Spriggs, K.A., Bushell, M., Willis, A.E., 2010. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol. Cell* 40, 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.028>.
- Streit, E., Naehrer, K., Rodrigues, I., Schatzmayr, G., 2013. Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *J. Sci. Food Agric.* 93, 2892–2899. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6225>.
- Sugita-Konishi, Y., Park, B.J., Kobayashi-Hattori, K., Tanaka, T., Chonan, T., Yoshikawa, K., Kumagai, S., 2006. Effect of cooking process on the deoxynivalenol content and its subsequent cytotoxicity in wheat products. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 1764–1768. <https://doi.org/10.1271/bbb.50571>.
- Terciolo, C., Maresca, M., Pinton, P., Oswald, I.P., 2018. Review article: role of satiety hormones in anorexia induction by trichothecene mycotoxins. *Food Chem. Toxicol.* 121, 701–714. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.034>.
- Theumer, M.G., Henneb, Y., Khoury, L., Snini, S.P., Tadriss, S., Canlet, C., Puel, O., Oswald, I.P., Audebert, M., 2018. Genotoxicity of aflatoxins and their precursors in human cells. *Toxicol. Lett.* 287, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.02.007>.
- Tronnet, S., Oswald, E., 2018. Quantification of colibactin-associated genotoxicity in HeLa cells by in cell western (ICW) using γ -H2AX as a marker. *Bio Protoc.* 8, e2771. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2771>.
- Turner, P.C., Rothwell, J.A., White, K.L.M., Gong, Y., Cade, J.E., Wild, C.P., 2008. Urinary deoxynivalenol is correlated with cereal intake in individuals from the United Kingdom. *Environ. Health Perspect.* 116, 21–25. <https://doi.org/10.1289/ehp.10663>.
- Vin, K., Riviere, G., Leconte, S., Cravedi, J.P., Fremy, J.M., Oswald, I.P., Roudot, A.C., Vasseur, P., Jean, J., Hulin, M., Sirot, V., 2020. Dietary exposure to mycotoxins in the French infant total diet study. *Food Chem. Toxicol.* 140, 111301. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111301>.
- Waché, Y., Valat, C., Postollec, G., Bougeard, S., Burel, C., Oswald, I.P., Fravallo, P., 2009. Impact of deoxynivalenol on the intestinal microflora of pigs. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms10010001>.
- Xue, M., Sub Kim, C., Healy, A.R., Wernke, K.M., Wang, Z., Frischling, M.C., Shine, E.E., Wang, W., Herzon, S.B., Crawford, J.M., 2019. Structure elucidation of colibactin and its DNA cross-links. *Science* 365, eaax2685. <https://doi.org/10.1126/science.aax2685>.
- Zhang, X., Li, J., Sejas, D.P., Rathbun, K.R., Bagby, G.C., Pang, Q., 2004. The fanconi anemia proteins functionally interact with the protein kinase regulated by RNA (PKR). *J. Biol. Chem.* 279, 43910–43919. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403884200>.
- Zhou, H.R., He, K., Landgraf, J., Pan, X., Pestka, J., 2014. Direct activation of ribosome-associated double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) by deoxynivalenol, anisomycin and ricin: a new model for ribotoxic stress response induction. *Toxins* 6, 3406–3425. <https://doi.org/10.3390/toxins6123406>.

**Supplementary material for “The food-borne contaminant deoxynivalenol exacerbates
DNA damage caused by a broad spectrum of genotoxic agents”**

Marion Garofalo^{a,b}, Delphine Payros^b, Eric Oswald^{b,c}, Jean-Philippe Nougayrède^{b*},
Isabelle P. Oswald^{a*}.

^aToxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

^bIRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRAE, ENVT, UPS, Toulouse, France

^cCHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service de Bactériologie-Hygiène, Toulouse, France

*Corresponding authors : isabelle.oswald@inrae.fr ; jean-philippe.nougayrede@inrae.fr

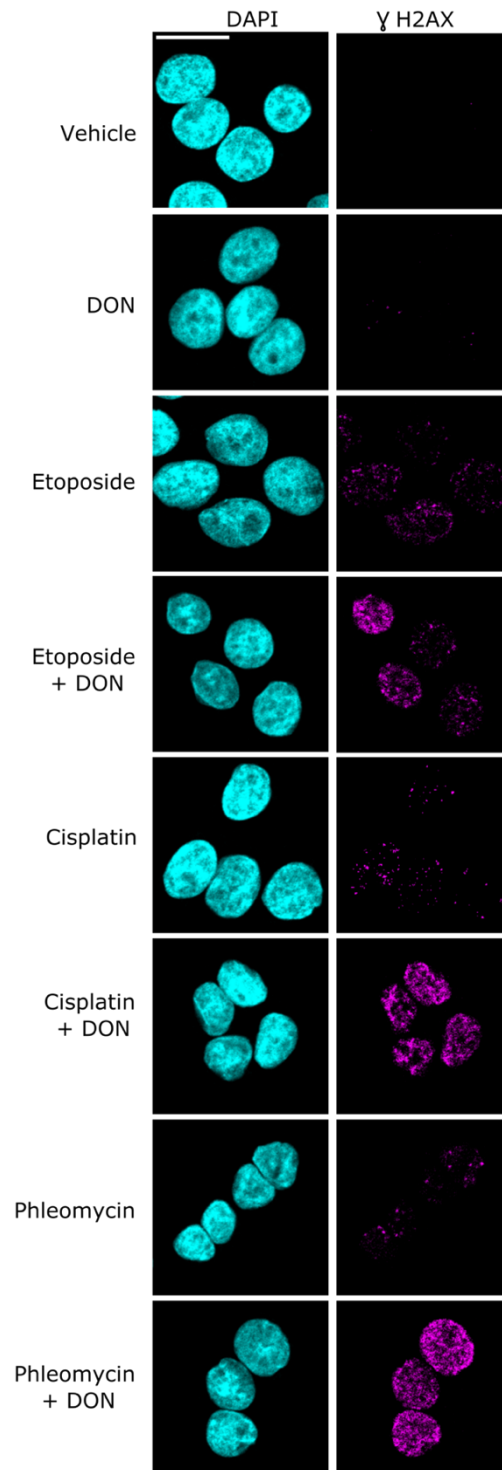


Figure S1 : DON exacerbates H2AX phosphorylation caused by etoposide, cisplatin and phleomycin in human HT-29 cancer cells. Human intestinal epithelial HT-29 cells were treated for 4 hours with 10 μ M DON or 10 μ M DMSO vehicle together with 5 μ M ETP, 25 μ M CPT or 5 μ M PHM, and γ H2AX was examined by immunofluorescence. Representative photos of HT-29 cells treated with ETP, CPT or PHM, alone or combined with DON or DMSO as a vehicle control. Scale bar = 20 μ m.

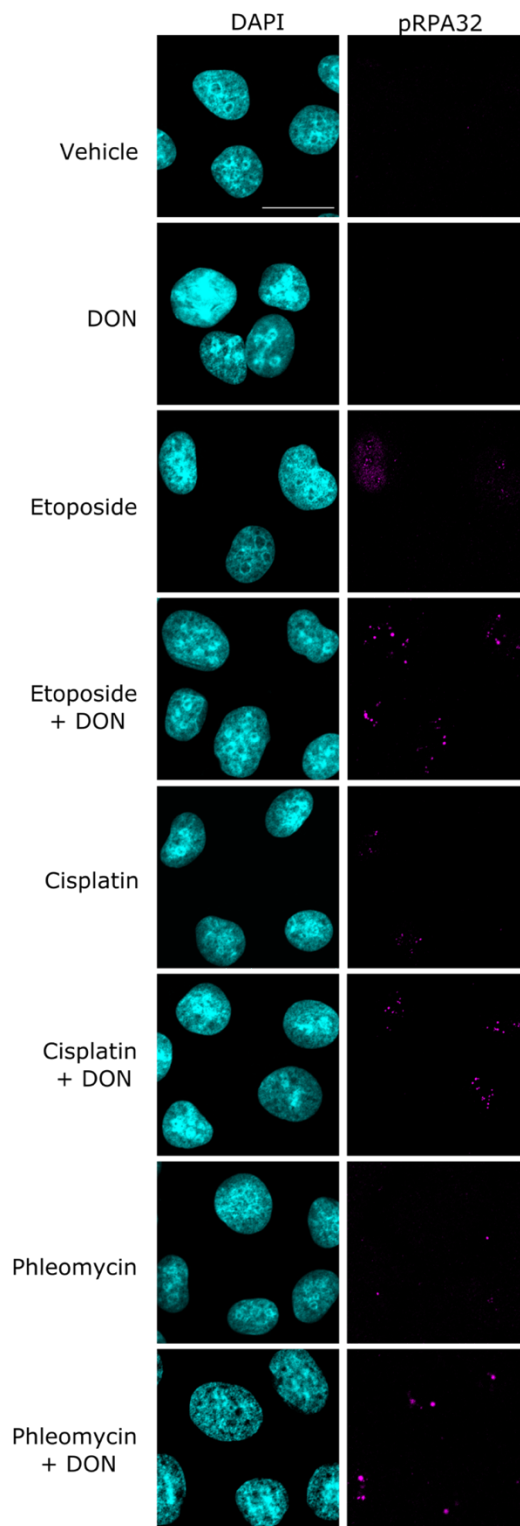


Figure S2 : DON exacerbates formation of phosphorylated RPA32 foci caused by etoposide, cisplatin and phleomycin. Non-transformed rat intestinal epithelial IEC-6 cells were treated for 4 hours with 10 μ M DON or 10 μ M DMSO vehicle combined with 3 μ M ETP, 20 μ M CPT or 3 μ M PHM, and pRPA32 was examined by immunofluorescence. Representative photos. Scale bar = 20 μ m.

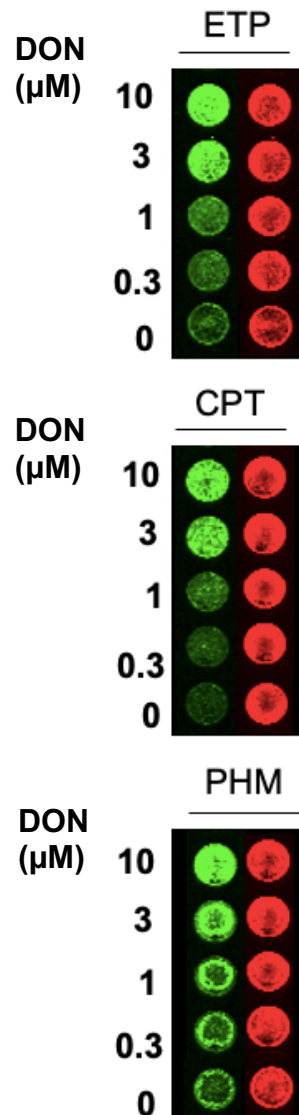


Figure S3 : γH2AX and DNA staining of IEC-6 cells treated with etoposide, cisplatin and phleomycin combined with DMSO vehicle or DON. After 4 h of incubation with different doses of DON and 5 μM ETP, 20 μM CPT, or 5 μM PHM, cells were stained for γH2AX (green) and DNA (red) using the In-Cell Western method. Genotoxic index values (γH2AX signal relative to DNA content, normalized to control cells) are shown in figure 3.

DNA quantification (% of untreated cells)				
	No genotoxin	ETP (5 μ M)	CPT (25 μ M)	PHM (5 μ M)
No ribotoxin	100	90.8 \pm 16.1	105.8 \pm 1.4	81.2 \pm 4.5
DON (10 μM)	94.5 \pm 3.5	103.2 \pm 4.2	101.5 \pm 5.4	98.6 \pm 5.4
DOM-1 (10 μM)	108.8 \pm 1.4	104.3 \pm 4.7	105.5 \pm 4.8	102.7 \pm 0.96
CHX (1 μM)	107.4 \pm 2.9	107.5 \pm 2.0	103.9 \pm 1.3	102.8 \pm 2.7
ANC (100 μM)	104.0 \pm 3.3	114.1 \pm 4.7	106.2 \pm 1.7	103.8 \pm 2.6

Table S1 : Cellular DNA quantification following treatment of IEC-6 cells with ribotoxins and genotoxins. DNA in the cells was calculated from DNA staining using the In-Cell Western method. Values were obtained after normalization from untreated cells considered as 100%.

Chapitre II

D'autres trichothécènes reproduisent-ils ce nouvel effet du DON ?

La première étude expérimentale, publiée en janvier 2022, a proposé un rôle de la ribotoxicité dans l'exacerbation de la génotoxicité. Le DON fait partie de la famille des trichothécènes, mycotoxines qui contaminent également l'alimentation à base de céréales. Comme les trichothécènes sont tous des inhibiteurs ribosomiaux, nous avons suggéré que ces toxines pourraient être potentialisateurs de génotoxicité. Cet article a permis de montrer que 5 autres trichothécènes contenus dans l'alimentation, à savoir la toxine T-2, le diacetoxysispreol, la fusarénone X, le nivalénol et NX, exacerbent aussi les dommages à l'ADN induits par une génotoxine modèle, par la colibactine, et par un pesticide alimentaire, le captane. Cet article a également permis de classer les trichothécènes selon leur cytotoxicité, leur ribotoxicité, et leur capacité à exacerber les dommages à l'ADN. Ce classement a permis de renforcer l'idée d'un lien entre ribotoxicité et exacerbation de la génotoxicité.

Cet article a été publié dans *Environmental Pollution* en novembre 2022.



A novel toxic effect of foodborne trichothecenes: The exacerbation of genotoxicity[☆]

Marion Garofalo^{a,b}, Delphine Payros^{a,b}, Marie Penary^b, Eric Oswald^{b,c},
Jean-Philippe Nougayrède^{b,1}, Isabelle P. Oswald^{a,*,1}

^a Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

^b IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRAE, ENVT, UPS, Toulouse, France

^c CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service de Bactériologie-Hygiène, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Mycotoxins
Pesticides
Microbiota
Colibactin
Carcinogenic potential

ABSTRACT

Trichothecenes (TCT) are very common mycotoxins. While the effects of DON, the most prevalent TCT, have been extensively studied, less is known about the effect of other trichothecenes. DON has ribotoxic, pro-inflammatory, and cytotoxic potential and induces multiple toxic effects in humans and animals. Although DON is not genotoxic by itself, it has recently been shown that this toxin exacerbates the genotoxicity induced by model or bacterial genotoxins. Here, we show that five TCT, namely T-2 toxin (T-2), diacetoxyscirpenol (DAS), nivalenol (NIV), fusarenon-X (FX), and the newly discovered NX toxin, also exacerbate the DNA damage inflicted by various genotoxins. The exacerbation was dose dependent and observed with phleomycin, a model genotoxin, captan, a pesticide with genotoxic potential, and colibactin, a bacterial genotoxin produced by the intestinal microbiota. For this newly described effect, the trichothecenes ranked in the following order: T-2>DAS > FX > NIV ≥ DON ≥ NX. The genotoxic exacerbating effect of TCT correlated with their ribotoxic potential, as measured by the inhibition of protein synthesis. In conclusion, our data demonstrate that TCT, which are not genotoxic by themselves, exacerbate DNA damage induced by various genotoxins. Therefore, foodborne TCT could enhance the carcinogenic potential of genotoxins present in the diet or produced by intestinal bacteria.

1. Introduction

Mycotoxins are the most prevalent natural dietary toxins and contaminate up to 70% of global crop production (Eskola et al., 2020). They represent a major issue for food safety (Payros et al., 2021a). These secondary metabolites, produced by microscopic fungi, resist industrial processes and cooking, and contaminate finished processed food. Trichothecenes (TCT) are one of the most prevalent types of mycotoxins, which include over 200 structurally related compounds with a common sesquiterpenoid skeleton (Polak-Śliwińska and Paszczyk, 2021). The differences in their substitution patterns allow TCT to be classified into four subgroups. Type A TCT (TCT-A) and type B TCT (TCT-B) are major food contaminants, whereas type C and D TCT rarely occur in food matrices. Type D TCT have attracted more attention as indoor pollutants (Gottschalk et al., 2008). TCT-A include T-2 toxin (T-2), diacetoxyscirpenol (DAS), and the newly discovered NX toxin (Varga et al., 2015;

Pierron et al., 2022). TCT-B, distinguishable from TCT-A due to the presence of ketonic oxygen at C-8, are mainly represented by deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), or fusarenon-X (FX) (Fig. 1). In Europe, almost 50% of cereals are contaminated with DON (Knutsen et al., 2017a), 16% with NIV (Knutsen et al., 2017b), and 10% with FX (Schothorst et al., 2003). T-2 was detected in 20% of European cereal samples (Knutsen et al., 2017c) and DAS was detected in 1.5% of European cereals and cereal-based food (Knutsen et al., 2018).

The toxicity of DON, the most prevalent foodborne TCT, is well documented. Acute DON poisoning causes vomiting, nausea, and diarrhoea, while chronic exposure results in food refusal, anorexia, reduced body weight gain, and altered immune responses (Terciolo et al., 2018; Pinton and Oswald, 2014; Payros et al. 2016). At the cellular level, DON triggers ribotoxicity, signalled by protein translation arrest and recruitment of MAP kinases, resulting in inflammation, cytotoxicity, and apoptosis, depending on the dose and duration of exposure (Payros

[☆] This paper has been recommended for acceptance by Dr Mingliang Fang.

* Corresponding author.

E-mail address: isabelle.oswald@inrae.fr (I.P. Oswald).

¹ Co senior authors.

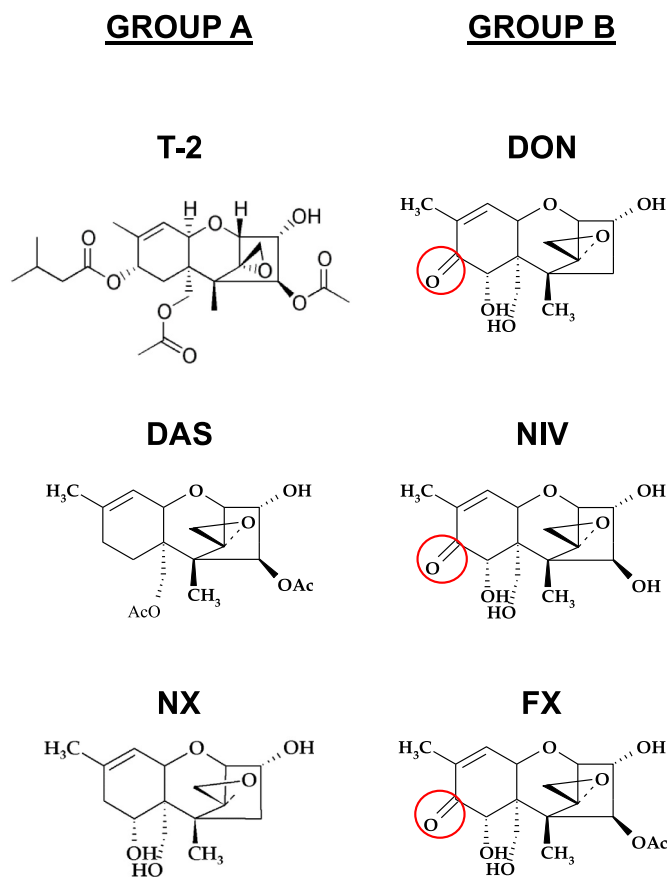


Fig. 1. Chemical structures of trichothecenes. Dietary TCT are classified in two main groups. Group A TCT include T-2 toxin (T-2), diacetoxyscirpenol (DAS), and NX. Groupe B TCT include deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), and fusarenon-X (FX). Group A TCT can be distinguished from group B TCT by the presence of a C₈ keto-oxygen (circled in red). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

et al., 2016; Alassane-Kpembé et al., 2013; Payros et al., 2021b). By contrast, other TCT are largely overlooked in toxicology studies (Seeboth et al., 2012; Alassane-Kpembé et al., 2017a; Alassane-Kpembé et al., 2017b; Pierron et al., 2022). Additional studies are needed, both because these TCT are widely distributed in food, and because they induce not only effects similar to DON, such as ribotoxicity, cytotoxicity, inflammation, vomiting, and food refusal, but also specific effects. For example, T-2 induces an oral irritant effect with skin blistering (Wyatt et al., 1973), FX exhibits potent antiviral properties (Tani et al., 1995), DAS induces intestinal cell hyperplasia (Weaver et al., 1981), NIV triggers murine dendritic cell necrosis, which has not been documented for other TCT (Luongo et al., 2010), and NX specifically targets the mitochondria (Solér et al., 2022). The differences between TCT are also at the molecular level, with differences in the translation step that they inhibit. Although all TCT are thought to inhibit peptide elongation (Foroud et al., 2019), T-2, DAS, NIV, and FX also inhibit the initiation step, and DON and FX also inhibit translation termination (Cundliffe and Davies, 1977).

DON, which is not genotoxic on its own, has recently been described as capable of increasing the genotoxicity induced by model or bacterial genotoxins (Payros et al., 2017; Garofalo et al., 2022). This effect is observed with genotoxins with different modes of action, and a role for ribotoxicity has been proposed (Garofalo et al., 2022). In this work, we show that the genotoxicity exacerbation is not only an effect caused by DON, but also caused by T-2, DAS, NIV, FX, and NX. Importantly, TCT do not only exacerbate the genotoxicity induced by a model genotoxin, but

they also exacerbate the genotoxicity induced by captan, a pesticide contaminating the food, and by colibactin, a genotoxin produced by *Escherichia coli* bacteria in the gut. Thus, although TCT are not genotoxic, they could enhance the carcinogenic potential of genotoxins present in the diet or in our microbiota.

2. Methods

2.1. Toxins and reagents

DON, NIV, T-2, FX, and DAS were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and captan was purchased from Dr. Ehrenstorfer (GmbH, Germany/CIL-Cluzeau). Phleomycin (PHM) (13.78 mM) was purchased from Invivogen (Toulouse, France). NX, obtained following the methods described by Aitken et al., was a generous gift from D. J. Miller (Aitken et al., 2019). Stock solutions were stored at -20°C . DON (5 mM), NIV (30 mM), T-2 (5 mM), FX (10 mM), DAS (3 mM), and captan (50 mM) were dissolved in DMSO; NX (5 mM) was dissolved in water.

2.2. Cell culture and treatments

Non-transformed rat intestinal epithelial cells (IEC-6, ATCC CRL-1592) were incubated in complete DMEM medium supplemented with 10% foetal calf serum, 1% non-essential amino acids (Fisher scientific, Hampton, USA), and 0.1 U/mL bovine insulin (Sigma-Aldrich), at 37°C with 5% CO_2 . The cells were split regularly to maintain exponential growth. A fresh culture was created from a liquid nitrogen stock every 30 passages. The cells were confirmed free of mycoplasma contamination by 16 S PCR. For viability assay, cells were seeded in white 96 well plates (Dutscher, Bruxelles, Belgium) and grown to reach $\sim 80\%$ confluence. Cells were then treated for 4 h, 8 h or 24 h with various doses of TCT (or DMSO vehicle) before viability was measured. For ribotoxicity and γH2AX measurement by In-Cell-Western, cells were seeded in black 96 well plates (Greiner bio-one, Les Ulis, France) and grown to reach $\sim 80\%$ confluence. For ribotoxicity measurement, cells were incubated for 4 h with various doses of TCT or DMSO vehicle followed by a 30 min incubation with puromycin (Sigma-Aldrich) at a final concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. For immunofluorescence microscopy, cells were seeded in slide chambers (LabTek) and grown to reach $\sim 80\%$ confluence before treatment. For PHM and captan-induced genotoxicity measurement, cells were co-treated for 4 h with 5 μM PHM or 5–10 μM of captan and various doses of TCT.

2.3. Cell infection with colibactin-producing bacteria

Colibactin is highly unstable and thus detection of its genotoxicity requires its production *de novo* by the bacteria in close proximity with the epithelial cells (Chagneau et al., 2022). The intestinal carcinogenic *E. coli* strain NC101 that produces the genotoxin colibactin, and the isogenic mutant strain NC101 ΔcIbP , which does not produce the toxin (Yang et al., 2020) were cultured in Lysogeny-broth (LB) Lennox medium overnight at 37°C with shaking. 500 μL of the LB culture was then inoculated in 9.5 mL of pre-warmed interaction medium DMEM with 25 mM Hepes (Fisher scientific) and grown at 37°C with shaking until the culture reached an optical density (OD) at 600 nm of 0.5. IEC-6 cells were washed 3 times with warm HBSS (Fisher scientific), and HBSS was replaced by DMEM Hepes interaction medium, supplemented or not with various doses of TCT. Then, the bacteria were added with a multiplicity of infection (MOI, number of bacteria per cell) of 10. The cells were infected for 4 h at 37°C with 5% CO_2 . Then, the cells were carefully washed 3 to 5 times with warm HBSS and incubated in complete DMEM medium (supplemented with 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin to kill remaining bacteria), \pm TCT for 4 h, and then processed for In-Cell-Western or microscopy. Cells were carefully rinsed 3 times with cold PBS and fixed for 20 min with PBS 4% formaldehyde.

2.4. Viability assay

Cell viability was assayed with the CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) as described (Khoshal et al., 2019). Luminescence was measured with a spectrophotometer (TECAN Spark, Mannedorf, Switzerland).

2.5. Ribotoxicity analysis by in-cell-western

Ribotoxicity was measured using protein synthesis inhibition as a surrogate. The measurement of protein synthesis by puromycin labelling was performed as described (Henrich, 2016). Puromycin was immuno-detected by In-Cell-Western using an anti-puromycin antibody (clone 12D10 diluted 1:5000; Millipore, Molsheim, France). GAPDH, which is constitutively expressed and has a half-life of 8 h (Dani et al., 1984), was used as a control. The anti GAPDH antibody was diluted 1:5000 (ABS16; Millipore). Secondary antibodies were diluted 1:5000

(IRDye 800 C W; Rockland, and IRDye 680RD Licor). Puromycin signal was normalized with the average fluorescence of puromycin-labelled control cells (Henrich, 2016).

2.6. Quantification of DNA damage by in-cell-western

In-Cell-Western was performed as previously described (Tronnet and Oswald, 2018). Fixed cells were permeabilized and stained with the primary antibody anti-γH2AX (20E3 diluted 1:200; Cell Signalling, Saint-Quentin en Yvelines, France). Secondary antibody (IRDye 800 C W diluted 1:1000; Rockland) and RedDot2 DNA marker (Biotium) were measured at 680 and 800 nm with a Sapphire Biomolecular Imager (Azure Biosystems). The genotoxic index was calculated by dividing the γH2AX signal by the corresponding DNA fluorescence and normalized with the average signal in control cells (Tronnet and Oswald, 2018).

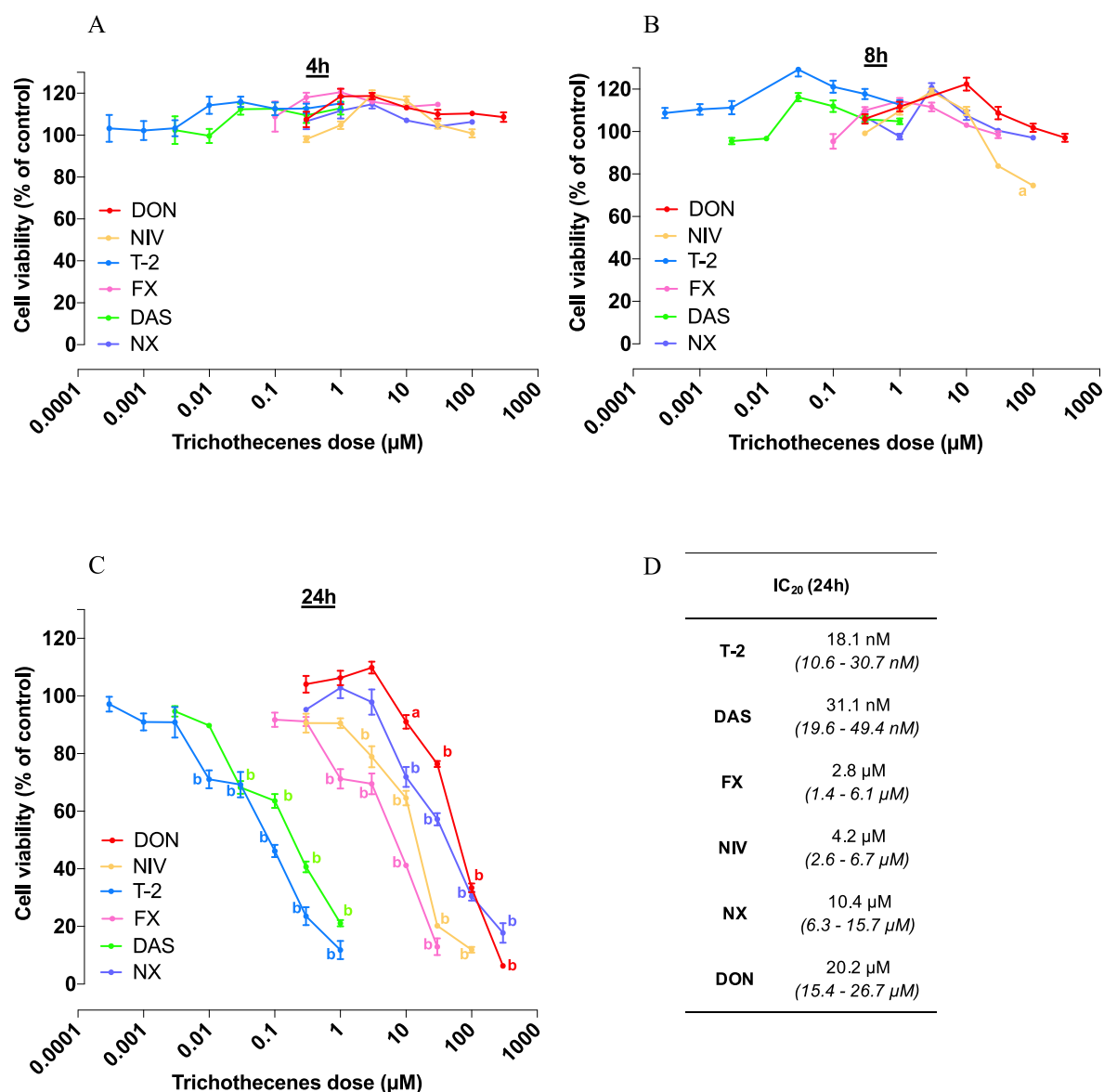


Fig. 2. Trichotheceenes are not cytotoxic after 4h and 8h treatment but induce dose-dependent cytotoxicity after 24h treatment of cultured intestinal cells. A, B, D: non-transformed rat intestinal epithelial IEC-6 cells were treated for 4 h (panel A), 8 h (panel B) and 24 h (panel C) with various concentrations of TCT and then viability was assessed by measuring cellular ATP levels. Data are expressed as mean ± SEM (3–6 independent experiments). P-values were calculated using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison (compared to the vehicle control cells), a: p < 0.01; b: p < 0.0001. D: concentrations that inhibited cell viability by 20% (IC₂₀) were calculated from the data presented in panel C. 95% confidence intervals are shown in italics.

2.7. Data analysis

GraphPad Prism 8.0 was used to calculate concentrations that inhibited the cell viability by 20% (IC_{20}), and the protein synthesis by 20% (20% PSI level), performing a four-parameter nonlinear regression model (sigmoidal dose-response analysis). Profile-likelihood confidence intervals were calculated from the nonlinear regressions. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison were performed. The data are expressed as mean \pm SEM.

3. Results

3.1. Trichothecenes induce a dose-dependent reduction in cell viability

As the intestinal tract is the primary target of TCT, the non-transformed intestinal epithelial cell line IEC-6 was used. Cytotoxicity was first evaluated 4 h and 8 h after TCT treatment, and no cytotoxicity was detected (Fig. 2A and B). The effect of TCT on cell viability was then evaluated 24 h after treatment, and we observed a dose-dependent inhibition of viability induced by DON, NIV, T-2, FX, DAS, and NX (Fig. 2C). IC_{20} values, which correspond to the dose inducing a 20% reduction of cell viability, were calculated for each TCT (Fig. 2D). For cytotoxicity, TCT were classified as follows: T-2 > DAS > FX > NIV > NX > DON.

3.2. Trichothecenes induce a dose-dependent ribotoxicity

Ribotoxicity is the main mode of action of TCT (Pestka, 2010). To quantify the ribotoxicity of the TCT, we examined translational inhibition, assessed by the incorporation of the protein translation marker puromycin in newly synthesized peptides (Henrich, 2016). The incorporated puromycin was quantified by immunofluorescence. All the TCT induced a dose-dependent ribotoxicity (Fig. 3A). Treatment with TCT did not induce a drop in GAPDH levels (which has an 8 h half-life), confirming that puromycin specifically labelled newly synthesized peptides (Fig. 3A, Fig. S3). The doses inducing a 20% reduction in protein synthesis were calculated (Fig. 3B). For their ribotoxic effect, the TCT were classified as follows: T-2 > DAS > FX > NIV > NX \geq DON.

3.3. Trichothecenes exacerbate the DNA damage induced by the drug phleomycin

The genotoxic exacerbation properties of TCT were first evaluated with phleomycin (PHM), a genotoxin commonly used as a model for genotoxicity assessments (Chen and Stubbe, 2005). IEC-6 cells were treated for 4 h with PHM and/or TCT. As expected, cells treated with PHM alone exhibited DNA damage signalled by the γ H2AX marker (Rogakou et al., 1998). TCT alone did not induce γ H2AX, indicating that they are not genotoxic by themselves. In contrast, all the trichothecenes induced exacerbation of PHM-induced DNA damage, in a dose-dependent manner (Fig. 4A). A significant increase occurred from 1 μ M for DON, 3 μ M for NX, 10 nM for T-2, 0.3 μ M for FX, 30 nM for DAS,

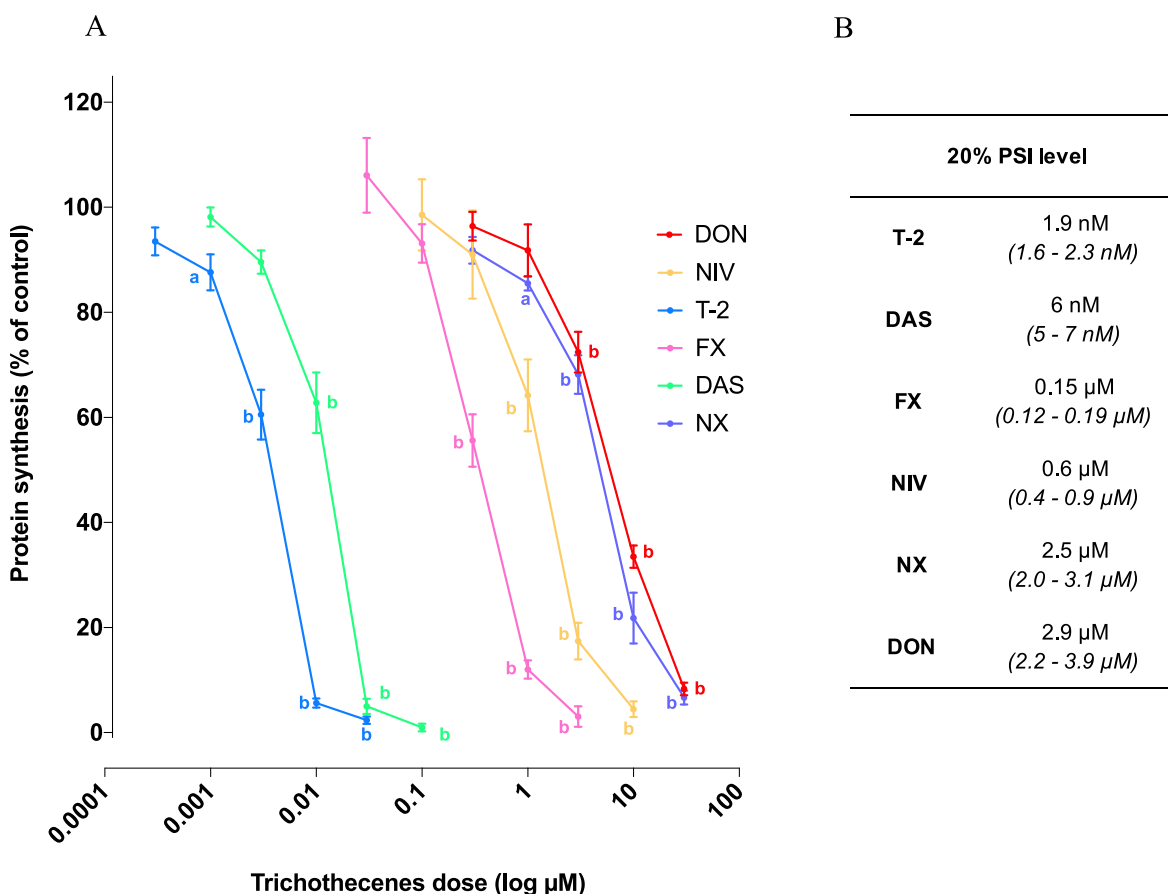
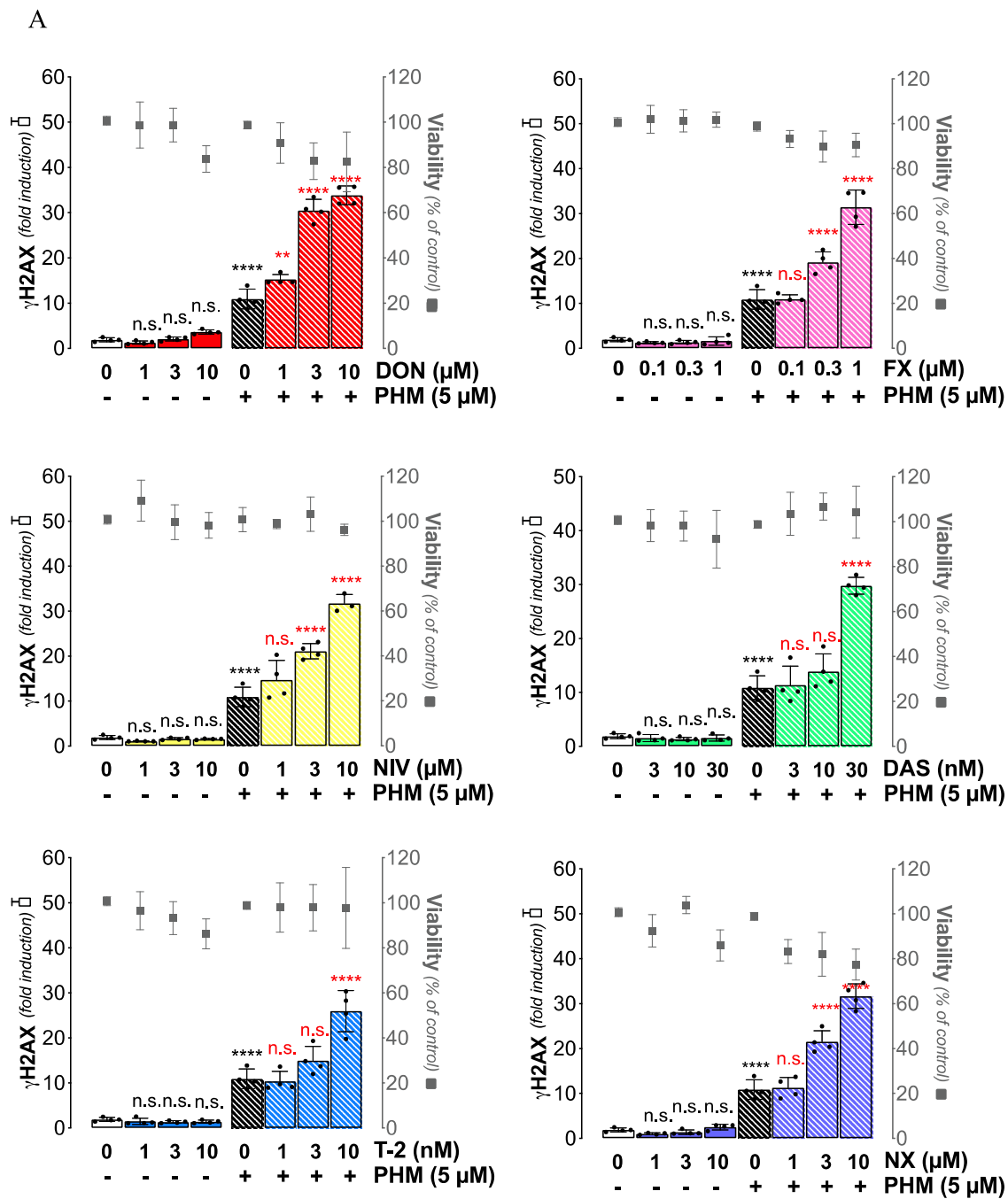


Fig. 3. Trichothecenes induce dose-dependent ribotoxicity in cultured intestinal epithelial cells. A: IEC-6 cells were treated for 4 h with different concentrations of TCT and then the cells were treated for 30 min with puromycin, a protein translation marker. Incorporation of puromycin into newly synthesized peptides was quantified with an anti-puromycin antibody by In-Cell-Western. All the data are expressed as mean \pm SEM (4 independent experiments). Values that are significantly different compared to the vehicle control are indicated: a: $p < 0.01$; b: $p < 0.0001$; B: Concentrations that inhibited the protein synthesis by 20% (20% PSI) were calculated from the data shown in panel A. 95% confidence intervals are shown in italics.



B

No effect dose					
T-2	DAS	FX	NIV	DON	NX
3 nM	10 nM	0.1 μ M	1 μ M	< 1 μ M	1 μ M

(caption on next page)

Fig. 4. Trichothecenes exacerbate the genotoxicity induced by the DNA-damaging drug phleomycin in a dose-dependent manner. A: IEC-6 cells were co-treated for 4 h with 5 μ M phleomycin (PHM) and increasing doses of DON (red), NIV (yellow), T-2 (blue), FX (pink), DAS (green), or NX (purple). Then, DNA damage was measured by quantification of H2AX phosphorylation by In-Cell-Western. γ H2AX fold induction (bars) is presented on the left Y axis, and the corresponding cells viability, measured through DNA quantification (grey squares) is presented on the right Y axis. All data are expressed as mean \pm SEM (4 independent experiments). For γ H2AX data, P-values were calculated using a one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison. Values that are significantly different compared to vehicle are indicated by black asterisks, and values that are significantly different from infected cells without TCT are indicated by red asterisks. *: $p < 0.1$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$, n. s.: not significant. B: No exacerbation doses for each TCT was defined from data in panel A. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

and 3 μ M for NX (Fig. 4B). The DNA damage exacerbation was confirmed in cells co-treated with phleomycin and a TCT-A (T-2 toxin) or a TCT-B (NIV), by detection of increased formation of 53BP1 foci and phosphorylation of RPA32, both markers of DNA damage (Vignard et al., 2013) (Dueva and Iliakis, 2020) (Supplementary methods 1, Fig. S1). The exacerbation of genotoxicity did not induce cell detachment, indicating that this effect was not a consequence of massive cell death (Fig. 4).

3.4. Trichothecenes exacerbate DNA damage induced by captan, a pesticide which contaminates food

We then tested the ability of TCT to exacerbate genotoxicity induced by a food-contaminating genotoxin, the pesticide captan, which can be found in fruits, vegetables, and cereals (Shinde et al., 2019). For this purpose, IEC-6 cells were exposed to captan and/or TCT for 4 h. Captan induced DNA damage on its own, and TCT induced an exacerbation of the genotoxicity of captan, in a dose-dependent manner. A significant increase occurred from 3 μ M for DON and NX, 1 nM for T-2, 1 μ M for FX, and 3 nM for DAS, and did not induce cell death (Fig. 5). The captan-induced genotoxicity exacerbation phenotype was confirmed by the increase of the 53BP1 and pRPA32 foci formation (Fig. S1).

3.5. Trichothecenes exacerbate the genotoxicity induced by colibactin, a genotoxin produced by members of the intestinal microbiota

We then determined whether TCT also exacerbate the genotoxicity induced by a bacterial genotoxin produced by the intestinal microbiota, colibactin. The genotoxicity of colibactin was measured by infecting IEC-6 cells with the live colibactin-producing bacterium *Escherichia coli* NC101. A direct contact between live colibactin-producing *E. coli* strain and eukaryotic cells is required to observe DNA damage (Chagneau et al., 2022; Nougayrède et al., 2006; Bossuet-Greif et al., 2018). Thus, cells were infected with strain NC101 and co-treated with TCT or not. Cells infected with *Escherichia coli* NC101 showed an increase in their γ H2AX signal, resulting from colibactin damage, whereas cells infected with the NC101 Δ cblp isogenic mutant, which is impaired for colibactin synthesis, did not exhibit DNA damage (Fig. 6, Fig. S2). In contrast, TCT-treated and NC101-infected cells exhibited an exacerbation of colibactin-induced DNA damage, which increased with the dose of TCT. A significant increase occurred at 3 μ M for DON, NX and NIV, 1 nM for T-2, 0.3 μ M for FX, and 10 nM for DAS (Fig. 6), and was not associated with cell death (Fig. 6). The exacerbation of colibactin-induced DNA damage by TCT-A and TCT-B was confirmed with the increased formation of 53BP1 and pRPA32 foci (Fig. S1). Exacerbation of DNA damage was not associated with increased colibactin production in bacteria treated with TCT, nor with an impact of TCT on bacterial growth (Supplementary methods 2, Fig. S2).

4. Discussion

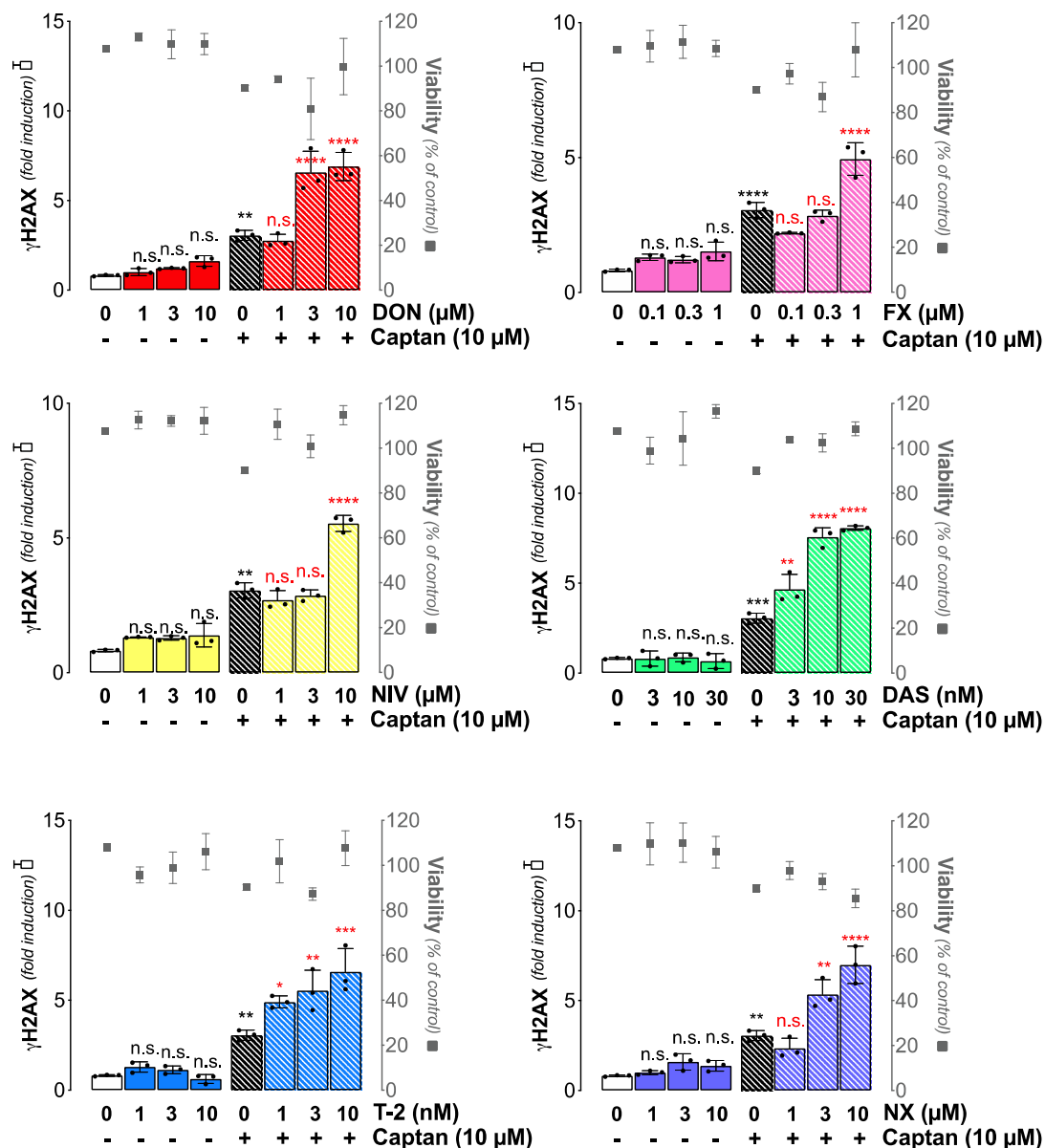
Food contamination by TCT is a public health issue of the utmost importance. TCT levels in foods are indeed high and may even increase in the future, in part due to climate change (Van Der Fels-Klerx et al., 2016). DON, which is not genotoxic, was recently described as a genotoxicity enhancer (Garofalo et al., 2022; Payros et al., 2017). In this work, we show that this is not only an effect caused by DON, but also a

novel effect attributable to at least five other TCT: NIV, T-2, FX, DAS and the recently discovered NX toxin. We examined the enhancement of genotoxicity by TCT in proliferating intestinal IEC-6 cells, as transmission of gene mutations occurs in dividing cells (Tomasetti & Vogelstein, 2015). In addition, proliferating cells are more sensitive to DON than differentiated cells (Luo et al., 2021). We found that TCT exacerbated not only the genotoxicity induced by the model genotoxin phleomycin, but also the genotoxicity induced by genotoxins from multiple exposure sources. Indeed, captan is a dietary fungicide with genotoxic properties, and colibactin is a bacterial genotoxin produced in the gut. For this newly identified effect, TCT were classified as follows: T-2 > DAS > FX > NIV \geq DON \geq NX.

The cytotoxicity of TCT was compared in non-transformed IEC-6 intestinal cells. Our data show that trichothecenes, which were not cytotoxic after a treatment lasting 4 h or 8 h, induced a dose-dependent inhibition of cell viability after 24 h. These data allowed the classification of trichothecenes as follows: T-2 > DAS > FX > NIV > NX > DON. Although to the best of our knowledge this is the first direct comparison and ranking of TCT cytotoxicity in IEC-6 cells, the classification is consistent with the literature. T-2 toxin is indeed known as the most toxic TCT, with IC₂₀ about 1000 times greater than others (Fernández-Blanco et al., 2018). DAS is slightly less cytotoxic than T-2, but more than FX (Moon et al., 2003), and FX is more cytotoxic than NIV and DON (Aupanun et al., 2019; Alassane-Kpembi et al., 2017a). We observed that IEC-6 cells exhibit a modest sensitivity to DON. Indeed, after 24 h of treatment, we found an IC₂₀ of 20.2 μ M when others found IC₂₀ of \approx 0.5 μ M in IPEC-1 cells, or \approx 3 μ M in Caco-2 cells (Alassane-Kpembi et al., 2015; Pierron et al., 2022). Our results are consistent with those obtained by Bianco et al., who found an IC₅₀ for DON of 50.2 μ M in IEC-6 cells, confirming the limited sensitivity of this cell line (Bianco et al., 2012). In addition, our results highlight that NX is approximately twice as cytotoxic as DON in IEC-6 cells. This result is consistent with the results of Pierron et al. which showed a higher inflammatory potential for NX compared to DON in porcine intestinal explants (Pierron et al., 2022). In contrast, the literature shows that NX-induced cytotoxicity is comparable to that of DON in HT-29 and Caco-2 cells (Varga et al., 2018; Pierron et al., 2022). Importantly, the doses of TCT that were cytotoxic after 24 h of exposure were higher than the doses that exacerbate genotoxicity (Table 1). This indicates that non-cytotoxic doses of TCT exacerbate genotoxicity. Because DNA damage is a source of genetic mutations through repair errors, this result raises questions about the fate of these cells (Basu, 2018). Cells co-exposed to genotoxins and TCT survive and could therefore pursue their cell cycle and division following repair of DNA damage. Further studies are needed to examine whether cells co-exposed to TCT and genotoxins could accumulate mutations, ultimately resulting in cellular transformation.

In this work, we also classified trichothecenes for their ribotoxicity. The ranking T-2 > DAS > FX > NIV > NX \geq DON is coherent with the TCT structures. The most ribotoxic trichothecenes carry substitutions thought to improve binding to the ribosome, such as the isovaleryl group at C₈ in T-2 or the acetyl groups at C₄ and C₁₅ in DAS (Wu et al., 2013; Wang et al., 2021). Differences in TCT ribotoxicity may also be related to divergences in structural rearrangements induced by ribosome binding (Garreau de Loubresse et al., 2014). Depending on the TCT structure, structural rearrangements could differ and induce variations in the mode of protein synthesis inhibition. We have previously suggested that DON-induced ribotoxicity is involved in the genotoxicity exacerbation

A

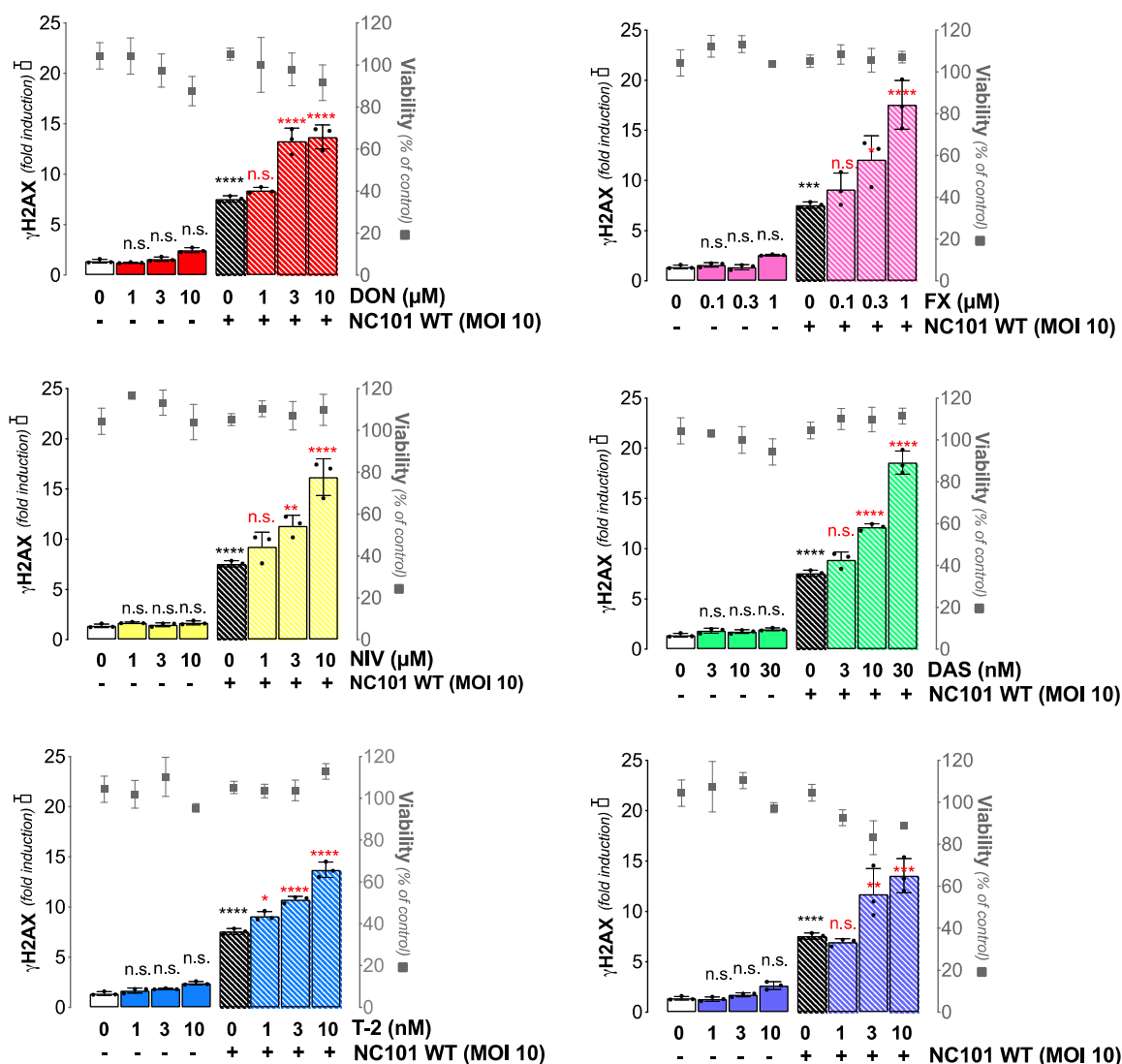


B

No effect dose					
T-2	DAS	FX	NIV	DON	NX
< 1 nM	< 3 nM	0.3 μ M	3 μ M	1 μ M	1 μ M

Fig. 5. Trichothecenes exacerbate the genotoxicity induced by the fungicide captan in a dose-dependent manner. A: IEC-6 cells were co-treated for 4 h with 10 μ M captan and increasing doses of DON (red), NIV (yellow), T-2 (blue), FX (pink), DAS (green), or NX (purple). Then, DNA damage was measured by quantification of H2AX phosphorylation by In-Cell-Western. γ H2AX fold induction (bars) is presented on the left Y axis, and the corresponding cell viability, measured through DNA quantification (grey squares) is presented on the right Y axis. All data are expressed as mean \pm SEM (3 independent experiments). For γ H2AX data, P-values were calculated using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison. Values that are significantly different compared to vehicle are indicated by black asterisks, and values that are significantly different from infected cells without TCT are indicated by red asterisks. *: $p < 0.1$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$, n. s.: not significant. B: No exacerbation dose for each TCT was determined from data shown in panel A. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

A



B

No effect dose					
T-2	DAS	FX	NIV	DON	NX
< 1 nM	3 nM	0.1 μM	0.3 μM	1 μM	1 μM

Fig. 6. Trichothecenes exacerbate the genotoxicity induced by the bacterial genotoxin colibactin in a dose-dependent manner. A: IEC-6 cells were infected 4 h with live colibactin-producing *E. coli* strain NC101 (multiplicity of infection of 10 bacteria per cell) with increasing doses of DON (red), NIV (yellow), T-2 (blue), FX (pink), DAS (green), or NX (purple). Cells were washed to remove bacteria and further incubated with the TCT for 4 h. Then, DNA damage was measured by quantification of H2AX phosphorylation by In-Cell-Western. γ H2AX fold induction (bars) is presented on the left Y axis, and the corresponding cells viability, measured through DNA quantification (squares) is presented on the right Y axis. All data are expressed as mean \pm SEM (3 independent experiments). For γ H2AX data, P-values were calculated using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison. Values that are significantly different compared to vehicle are indicated by black asterisks, and values that are significantly different from infected cells without TCT are indicated by red asterisks. *: $p < 0.1$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$, n. s.: not significant. B: No exacerbation doses for each TCT was determined from data shown in Fig. 6A. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 1
Trichothecenes classification for cytotoxicity, ribotoxicity, and capacity to exacerbate the genotoxicity. Green boxes: doses inducing no significant cytotoxicity at 4–24 h, ribotoxicity or genotoxicity exacerbation. Red boxes: doses inducing significant cytotoxicity, ribotoxicity or genotoxicity exacerbation.

		TCT dose											
		0.3	1	3	10	30	0.1	0.3	1	3	10	30	100
		nM	nM	nM	nM	nM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM
Cytotoxicity (4h)	T-2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	DAS	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	FX	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	NIV	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	DON	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	NX	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Cytotoxicity (8h)	T-2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	DAS	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	FX	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	NIV	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	DON	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	NX	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Cytotoxicity (24h)	T-2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	DAS	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	FX	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	NIV	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	DON	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	NX	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Ribotoxicity (4h)	T-2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	DAS	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	FX	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	NIV	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	DON	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	NX	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Genotoxicity exacerbation (PHM) (4h)	T-2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	DAS	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	FX	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	NIV	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	DON	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	NX	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Genotoxicity exacerbation (captan) (4h)	T-2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	DAS	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	FX	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	NIV	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	DON	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	NX	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Genotoxicity exacerbation (colibactin) (8h)	T-2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	DAS	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	FX	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	NIV	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	DON	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	NX	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green

phenotype. Indeed, ribotoxic compounds reproduced the effect, while the non-ribotoxic DON derivative DOM-1, did not (Garofalo et al., 2022). The correlation between TCT ribotoxicity and genotoxicity exacerbating doses observed in this work (Table 1) support this hypothesis. Interestingly, TCT with substitutions that increase affinity to the ribosome have a greater capacity to exacerbate genotoxicity. This suggests that there is a structure-function link between ribotoxicity and genotoxicity exacerbation. TCT could be classified into 3 subgroups according to their capacity to exacerbate the genotoxicity, with regard

to their affinity with the ribosome: T-2, DAS > FX > NIV, NX, DON. We also observed a parallel between ribotoxic and cytotoxic doses (Table 1). Ribosome inhibition is the main mechanism of action of TCT and is therefore probably the cause of cytotoxicity. This could be explained by the recruitment of MAP kinases in response to ribotoxic stress. Activated MAP kinases in turn activate apoptotic pathways (Yang et al., 2000).

Several mechanisms could be involved in the ribosome-dependent exacerbation of genotoxicity. In response to DNA damage, cells reprogram their gene expression to synthesize proteins of the DNA damage

response (Spriggs et al., 2010). TCT-induced ribotoxicity could disrupt the production of these stress response proteins. Through their ribotoxic effect, TCT can induce inflammation (Pestka, 2010; Garcia et al., 2018), which represses the DNA damage response (Jaiswal et al., 2000). Finally, it has been documented that DON activates the protein kinase R (PKR), which triggers the inhibition of the DNA damage repair and sensitizes cells to DNA damage (Zhou et al., 2014). As they share structural similarities with DON, TCT could also recruit PKR and induce sensitization to DNA damage. Further work is required to understand how ribotoxicity results in this novel TCT effect.

We observed that the exacerbation of genotoxicity occurred at realistic doses of TCT. The European Food Safety Authority (EFSA) established a no observable adverse effect level (NOAEL) for DON of 100 µg/kg body weight (bw)/day. This NOAEL was based on decreased feed intake and body weight in mice exposed to DON for two years (Knutsen et al. 2017a). For DAS, the NOAEL of 65 µg/kg bw/day is based on hematotoxicity and immunotoxicity observed in cancer patients (Knutsen et al., 2018). The Benchmark Dose Limit (BMDL₀₅) for NIV, based on a reduction in white blood cells counts in a 90-day rat study, is 350 µg/kg bw/day (Knutsen et al., 2017b). The BMDL₁₀ for T-2, derived from reduction in the number of peripheral leucocytes in a sub chronic study in rats, is 3.3 µg/kg bw/day (Knutsen et al., 2017c). Estimating, like Maresca, 2013, that for a human weighing 70 kg, the small intestine content is 1 L, these doses can be converted to intestinal concentrations of 23.6 µM DON, 0.5 µM T-2, 12.4 µM DAS, and 78.4 µM NIV ((NOAEL or BMDL x 70)/molar mass of the TCT). Our study shows no effect doses for genotoxicity exacerbation well below these reference values, with 1 µM, 3 nM, 10 nM, and 3 µM for DON, T-2, DAS and NIV, respectively. In conclusion, genotoxicity exacerbation could occur at realistic doses of TCT. If confirmed, genotoxicity exacerbation should be considered as a sensitive endpoint for the definition of reference values by EFSA. In addition, we observed that structurally related trichothecenes displayed comparable effects and could therefore be classified into 3 subgroups: T-2, DAS > FX > NIV, NX, DON. As TCT frequently co-occur in foodstuffs (Alassane-Kpembé et al., 2017b), it would be appropriate to set group TDIs for TCT, as it has been done for other groups of structurally related mycotoxins (Steinkellner et al. 2019).

We observed the genotoxicity exacerbation by TCT with three genotoxins from various sources and with different modes of action on DNA. Indeed, phleomycin is a radiomimetic drug which causes the oxidation of bases and strand breaks (Chen and Stubbe, 2005). Captan induces oxidative DNA damage and strand breaks (Fernandez-Vidal et al., 2019). Colibactin induces DNA interstrand crosslinks (Bossuet-Greif et al., 2018). Thus, this study confirms that the DNA damage exacerbation phenotype occurs with genotoxins with diverse modes of action (Garofalo et al., 2022).

The exacerbation effect occurred with captan, a pesticide which can contaminate fruits and vegetables, but also cereals, which are the main source of TCT (Shinde et al., 2019). Captan has been associated with multiple myeloma in farmers (Presutti et al., 2016), and is classified by the European Commission as “suspected of causing cancer” (European Commission, 2008). Notably, the exacerbation effect occurred at realistic doses of captan. The NOAEL for captan is indeed 25 mg/kg bw per day (based on reduced body weight gain in a two-year study in rats) (Anastassiadou et al., 2020), which corresponds to an intestinal concentration of 5.8 mM. Here, the exacerbated genotoxic effect of captan was observed with a dose as low as 10 µM, well below the NOAEL. Interestingly, TCT also exacerbate the effect of colibactin, an endogenous genotoxin produced by the intestinal microbiota throughout the host's life. Indeed, approximately 15% of 3-day-old neonates are colonized by colibactin-producing *E. coli* (Payros et al., 2014), and 25% of adults harbour these bacteria (Putze et al., 2009; Tenaillon et al., 2010; Johnson et al., 2008). In addition, the prevalence of the B2 phylogenetic group of *E. coli*, which includes up to 50% of colibactin-producing strains, is increasing in developed countries (Tenaillon et al., 2010). The intestinal microbiome also encodes other bacterial genotoxins such

as cytolethal distending toxins (Taieb et al., 2016). Thus, humans are potentially co-exposed to TCT together with endogenous genotoxins produced by the microbiota as well as multiple exogenous diet-borne genotoxins, such as captan, alcohol-derivatives (Brooks and Zakhari, 2014), components of red meat (Bastide et al., 2011) and other genotoxic pesticides such as glyphosate (International Agency for Research on Cancer, 2017). Given the high prevalence of TCT in foods, it is conceivable that TCT could exacerbate the effect of the multiple genotoxic agents to which we are exposed.

5. Conclusion

We report that even though trichothecenes are not genotoxic by themselves, these contaminants promote the genotoxicity of genotoxins which are in the diet, such as pesticides, or are produced by the intestinal microbiota. Considering the wide prevalence of both TCT and genotoxins, a large portion of the population could be impacted by this novel effect. This is alarming because DNA damage drives cancer development (Basu, 2018). A preliminary report on a large-scale epidemiological study in the European Union has suggested a link between long-term exposure to DON and an increased risk of colon cancer (Huybrechts et al., 2019). If confirmed, the exacerbation of DNA damage by DON could be a key to explaining this epidemiological link. Here, we show that DON is not the only dietary TCT to exhibit this genotoxicity-exacerbating property. There is an urgent need for additional studies on the impact of TCT on carcinogenesis induced by other environmental toxicants.

Credit author statement

Marion Garofalo: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft, Visualization. **Delphine Payros:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Visualization. **Marie Penary:** Investigation, Validation. **Eric Ostwald:** Conceptualization, Writing - Review & Editing, Supervision, Fund Acquisition. **Jean-Philippe Nougayrede:** Conceptualization, Writing - Review & Editing, Supervision, Project administration, Fund Acquisition. **Isabelle P. Ostwald:** Conceptualization, Writing - Review & Editing, Supervision, Project administration, Fund Acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

We thank David J. Miller for the gift of NX. We thank Julien Vignard (Toxalim) for the scientific input and help for immunofluorescence experiments. We are grateful to Elisha Oliver for editing the language. This work was supported by grants from the French Agence Nationale de la Recherche (Genofood ANR-19-CE34 and GenoMyc ANR-22-CE34). MG was supported by a fellowship from the French ministry for Higher Education and Research.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120625>.

References

- Aitken, A., Miller, J.D., McMullin, D.R., 2019. Isolation, chemical characterization, and hydrolysis of the trichothecene 7 α -hydroxy, 15-deacetylcalonecitrin (3ANX) from *Fusarium graminearum* DAOMC 242077. *Tetrahedron Lett.* 60, 852–856. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.02.025>.
- Alassane-Kpembé, I., Kolf-Clauw, M., Gauthier, T., Abrami, R., Abiola, F.A., Oswald, I.P., Puel, O., 2013. New insights into mycotoxin mixtures: the toxicity of low doses of Type B trichothecenes on intestinal epithelial cells is synergistic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.05.023>.
- Alassane-Kpembé, I., Puel, O., Oswald, I.P., 2015. Toxicological interactions between the mycotoxins deoxynivalenol, nivalenol and their acetylated derivatives in intestinal epithelial cells. *Arch. Toxicol.* 8, 1337–1346. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1309-4>.
- Alassane-Kpembé, I., Gerez, J.R., Cossalter, A.M., Neves, M., Laffitte, J., Naylies, C., Lippi, Y., Kolf-Clauw, M., Bracarense, A.P.F.L., Pinton, P., Oswald, I.P., 2017a. Intestinal toxicity of the type B trichothecene mycotoxin fusarenon-X: whole transcriptome profiling reveals new signaling pathways. *Sci. Rep.* 7, 7530. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07155-2>.
- Alassane-Kpembé, I., Puel, O., Pinton, P., Cossalter, A.M., Chou, T.C., Oswald, I.P., 2017b. Co-exposure to low doses of the food contaminants Deoxynivalenol and Nivalenol has a synergistic inflammatory effect on intestinal explants. *Arch. Toxicol.* 91, 2677–2687. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1902-9>.
- Anastasiadou, M., Arena, M., Auteri, D., Brancato, A., Bura, L., Carrasco Cabrera, L., Chaideftou, E., Chiusolo, A., Crivellente, F., De Lentdecker, C., et al., 2020. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance captan. *EFSA J.* 18, 6230. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6230>.
- Aupanun, S., Poapolathep, S., Phuektes, P., Giorgi, M., Zhang, Z., Oswald, I.P., Poapolathep, A., 2019. Individual and combined mycotoxins deoxynivalenol, nivalenol, and fusarenon-X induced apoptosis in lymphoid tissues of mice after oral exposure. *Toxicol.* 165, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2019.04.017>.
- Bastide, N.M., Pierre, F.H., Corpet, D.E., 2011. Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prev. Res.* 4, 177–184. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0113>.
- Basu, A.K., 2018. DNA damage, mutagenesis and cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 970. <https://doi.org/10.3390/ijms19040970>.
- Bianco, G., Fontanella, B., Severino, L., Quaroni, A., Autore, G., Marzocco, S., 2012. Nivalenol and deoxynivalenol affect rat intestinal epithelial cells: a concentration related study. *PLoS One* 7, e52051. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052051>.
- Bossuet-Greif, N., Vignard, J., Taieb, F., Mirey, G., Dubois, D., Petit, C., Oswald, E., Nougayrède, J.P., 2018. The colibactin genotoxin generates DNA interstrand cross-links in infected cells. *mBio* 9, e02393. <https://doi.org/10.1128/mBio.02393-17>.
- Brooks, P.J., Zakhari, S., 2014. Acetaldehyde and the genome: beyond nuclear DNA adducts and carcinogenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* 55, 77–91. <https://doi.org/10.1002/em.21824>.
- Chagneau, C.V., Payros, D., Tang-Fichaux, M., Auvray, F., Nougayrède, J.P., Oswald, E., 2022. The pks island: a bacterial Swiss army knife? *Trends Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.05.01>.
- Chen, J., Stubbe, J., 2005. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 5, 102–112. <https://doi.org/10.1038/nrc1547>.
- Cundliffe, E., Davies, J.E., 1977. Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11, 491–499. <https://doi.org/10.1128/AAC.11.3.491>.
- Dani, C., Piechaczyk, M., Audigier, Y., El Sabouty, S., Cathala, G., Marty, L., Fort, P., Blanchard, J.M., Jeanteur, P., 1984. Characterization of the transcription products of glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase gene in HeLa cells. *Eur. J. Biochem.* 14, 299–304. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08552.x>.
- Dueva, R., Iliakis, G., 2020. Replication protein A: a multifunctional protein with roles in DNA replication, repair and beyond. *NAR Cancer* 2. <https://doi.org/10.1093/narcan/zcaa022>.
- Eskola, M., Elliott, C.T., Hajšlová, J., Steiner, D., Krška, R., 2020. Towards a dietary-exposome assessment of chemicals in food: an update on the chronic health risks for the European consumer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60, 1890–1911. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1612320>.
- European Commission, 2008. Regulation No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC and amending Regulation (EC) No 1907/2006. *Off. J. Eur. Union* 354, 1–1355.
- Fernández-Blanco, C., Elmo, L., Waldner, T., Ruiz, M.J., 2018. Cytotoxic effects induced by patulin, deoxynivalenol and toxin T2 individually and in combination in hepatic cells (HepG2). *Food Chem. Toxicol.* 120, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.019>.
- Fernandez-Vidal, A., Arnaud, L.C., Maumus, M., Chevalier, M., Mirey, G., Salles, B., Vignard, J., Boutet-Robinet, E., 2019. Exposure to the fungicide captan induces DNA base alterations and replicative stress in mammalian cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 3, 286–297. <https://doi.org/10.1002/em.22268>.
- Foroud, N.A., Baines, D., Gagkaeva, T.Y., Thakor, N., Badea, A., Steiner, B., Bürstmayr, M., Bürstmayr, H., 2019. Trichothecenes in cereal grains – an update. *Toxins* 11, 634. <https://doi.org/10.3390/toxins11110634>.
- García, G.R., Payros, D., Pinton, P., Dogi, C.A., Laffitte, J., Neves, M., Gonzalez-Pereyra, M.L., Cavaglieri, L.R., Oswald, I.P., 2018. Intestinal toxicity of deoxynivalenol is limited by *Lactobacillus rhamnosus* RC007 in pig jejunum explants. *Arch. Toxicol.* 92, 983–993. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2083-x>.
- Garreau de Loubresse, N., Prokhorova, I., Holtkamp, W., Rodnina, V., Yusupova, G., Yusupov, M., 2014. Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome. *Nature* 513, 517–522. <https://doi.org/10.1038/nature13737>.
- Garofalo, M., Payros, D., Oswald, E., Nougayrède, J.P., Oswald, I.P., 2022. The foodborne contaminant deoxynivalenol exacerbates DNA damage caused by a broad spectrum of genotoxic agents. *Sci. Total Environ.* 820, 153280. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153280>.
- Gottschalk, C., Bauer, J., Meyer, K., 2008. Detection of satratoxin g and h in indoor air from a water-damaged building. *Mycopath* 166, 103–107. <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9126-z>.
- Henrich, C.J., 2016. A microplate-based nonradioactive protein synthesis assay: application to TRAIL sensitization by protein synthesis inhibitors. *PLoS One* 11, e0165192. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165192>.
- Huybrechts, K., Claeys, L., Ferrari, P., Altieri, A., Arcella, D., Papadimitriou, C., Casagrande, C., Nicolas, G., Biessy, C., Zavadil, J., Gunter, M., De Saeger, S., De Boevre, M., 2019. Impact of Chronic Multi-Mycotoxin Dietary Exposure on Colorectal and Liver Cancer Risk in Europe. *World Mycotoxin Forum - Book of Abstracts*, p. 70.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 2017. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. In: 'Some Organophosphate Insecticides and Herbicides', Lyon (FR), vol. 112. Bookshelf ID: NBK436774.
- Jaiswal, M., Lauroso, N.F., Burgart, L.J., 2000. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res.* 60, 184–190.
- Johnson, J.R., Johnston, B., Kuskowski, M.A., Nougayrède, J.P., Oswald, E., 2008. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3906–3911. <https://doi.org/10.1128/JCM.00949-08>.
- Khoshal, A.K., Novak, B., Martin, P.G.P., Jenkins, T., Neves, M., Schatzmayr, G., Oswald, I.P., Pinton, P., 2019. Co-Occurrence of DON and emerging mycotoxins in worldwide finished pig feed and their combined toxicity in intestinal cells. *Toxins* 12, 727. <https://doi.org/10.3390/toxins11120727>.
- Knutsen, H.K., Alexander, J., Barregard, L., Bignami, M., Bruschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., et al., 2017a. Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA J.* 15, e04718. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4718>.
- Knutsen, H.K., Barregard, L., Bignami, M., Bruschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Edler, L., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., et al., 2017b. Appropriateness to set a group health based guidance value for nivalenol and its modified forms. *EFSA J.* 15, 4751. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4751>.
- Knutsen, H.K., Barregard, L., Bignami, M., Bruschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Edler, L., Grasl-Kraupp, B., Hoogenboom, L., et al., 2017c. Appropriateness to set a group health based guidance value for T2 and HT2 toxin and its modified forms. *EFSA J.* 15, 4655. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4655>.
- Knutsen, H.K., Alexander, J., Barregard, L., Bignami, M., Bruschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., et al., 2018. Risk to human and animal health related to the presence of 4,15-diacetoxyscirpenol in food and feed. *EFSA J.* 16, 8. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5367>.
- Luo, S., Terziolo, C., Neves, M., Puel, S., Naylies, C., Lippi, Y., Pinton, P., Oswald, I.P., 2021. Comparative sensitivity of proliferative and differentiated intestinal epithelial cells to the food contaminant, deoxynivalenol. *Environ. Pollut.* 277, 116818. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116818>.
- Luongo, D., Severino, L., Bergamo, P., D'Arienzo, R., Rossi, M., 2010. Trichothecenes NIV and DON modulate the maturation of murine dendritic cells. *Toxicol.* 55, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2009.06.039>.
- Maresca, M., 2013. From the gut to the brain: journey and pathophysiological effects of the food-associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. *Toxins* 23, 784–820. <https://doi.org/10.3390/toxins5040784>.
- Moon, Y., Uzarski, R., Pestka, J.J., 2003. Relationship of trichothecene structure to COX-2 induction in the macrophage: selective action of type B (8-keto) trichothecenes. *J. Toxicol. Environ. Health A* 66, 1967–1983. <https://doi.org/10.1080/713853950>.
- Nougayrède, J.P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., Oswald, E., 2006. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 313, 848–851. <https://doi.org/10.1126/science.1127059>.
- Payros, D., Secher, T., Boury, M., Brehin, C., Ménard, S., Salvador-Cartier, C., Cuevas-Ramos, G., Watrin, C., Marcq, I., Nougayrède, J.P., et al., 2014. Maternally acquired genotoxic *Escherichia coli* alters offspring's intestinal homeostasis. *Gut Microb.* 5, 313–512. <https://doi.org/10.4161/gmic.28932>.
- Payros, D., Alassane-Kpembé, I., Pierron, A., Loiseau, N., Pinton, P., Oswald, I.P., 2016. Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms. *Arch. Toxicol.* 90, 2931–2957. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1826-4>.
- Payros, D., Dobrindt, U., Martin, P., Secher, T., Bracarense, A.P.F.L., Boury, M., Laffitte, J., Pinton, P., Oswald, E., Oswald, I.P., 2017. The food contaminant deoxynivalenol exacerbates the genotoxicity of gut microbiota. *mBio* 8, e007–e017. <https://doi.org/10.1128/mBio.00007-17>.
- Payros, D., Garofalo, M., Pierron, A., Soler-Vasco, L., Al-Ayoubi, C., Maruo, V.M., Alassane-Kpembé, I., Pinton, P., Oswald, I.P., 2021a. Mycotoxins in human food: a challenge for research. *Cah. Nutr. Diet.* 56, 170–183. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2021.02.001>.
- Payros, D., Alassane-Kpembé, I., Laffitte, J., Lencina, C., Neves, M., Bracarense, A.P., Pinton, P., Ménard, S., Oswald, I.P., 2021b. Dietary exposure to the food contaminant deoxynivalenol triggers colonic breakdown by activating the mitochondrial and the death receptor pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* 65, e2100191. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202100191>.

- Pestka, J.J., 2010. Deoxynivalenol-induced proinflammatory gene expression: mechanisms and pathological sequelae. *Toxins* 2, 1300–1317. <https://doi.org/10.3390/toxins2061300>.
- Pierron, A., Neves, M., Puel, S., Lippi, Y., Soler, L., Miller, J.D., Oswald, I.P., 2022. Intestinal toxicity of the new type A trichothecenes, NX and 3ANX. *Chemosphere* 288, 132415. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132415>.
- Pinton, P., Oswald, I.P., 2014. Effect of deoxynivalenol and other type B trichothecenes on the intestine: a review. *Toxins* 6, 1615–1643. <https://doi.org/10.3390/toxins6051615>.
- Polak-Sliwińska, M., Paszczyk, B., 2021. Trichothecenes in food and feed, relevance to human and animal health and methods of detection: a systematic review. *Molecules* 26, 454. <https://doi.org/10.3390/molecules26020454>.
- Presutti, R., Harris, S.A., Kachuri, L., Spinelli, J.J., Pahwa, M., Blair, A., Zahm, S.H., Cantor, K.P., Weisenburger, D.D., Pahwa, P., et al., 2016. Pesticide exposures and the risk of multiple myeloma in men: an analysis of the North American Pooled Project. *Int. J. Cancer* 139, 1703–1714. <https://doi.org/10.1002/ijc.30218>.
- Putze, J., Hennequin, C., Nougayrède, J.P., Zhang, W., Homburg, S., Karch, H., Bringer, M.A., Fayolle, C., Carniel, E., Rabsch, W., Oelschlaeger, T.A., Oswald, E., Forestier, C., Hacker, J., Dobrindt, U., 2009. Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family *Enterobacteriaceae*. *Infect. Immun.* 77, 4696–4703. <https://doi.org/10.1128/IAI.00522-09>.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., Bonner, W.M., 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273, 5858–5868. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>.
- Schothorst, R.C., van Egmond, H.P., 2003. Report from SCOOP task 3.2.10: collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. Subtask: trichothecenes', *Toxicol. Lett.* 153, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.045>.
- Seeboth, J., Solinhac, R., Oswald, I.P., Guzylack-Piriou, L., 2012. The fungal T-2 toxin alters the activation of primary macrophages induced by TLR-agonists resulting in a decrease of the inflammatory response in the pig. *Vet. Res.* 43, 35. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-35>.
- Shinde, R., Shiragave, P., Lakade, A., Thorat, P., Banerjee, K., 2019. Multi-residue analysis of captan, captafol, folpet, and iprodione in cereals using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 36, 1688–1695. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1662953>.
- Soler, L., Miller, I., Terciolo, C., Hummel, K., Nöbauer, K., Neves, M., Oswald, I.P., 2022. Exposure of intestinal explants to NX, but not to DON, enriches the secretome in mitochondrial proteins. *Arch. Toxicol.* <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03318-x>.
- Spriggs, K.A., Bushell, M., Willis, A.E., 2010. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol. Cell* 40, 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.028>.
- Steinkellner, H., Binaglia, M., Dall'Asta, C., Gutleb, A.C., Metzler, M., Oswald, I.P., Parent-Massin, D., Alexander, J., 2019. Combined hazard assessment of mycotoxins and their modified forms applying relative potency factors: zearalenone and T2/HT2 toxin. *Food Chem. Toxicol.* 131, 110599. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110599>.
- Taieb, F., Petit, C., Nougayrède, J.P., Oswald, E., 2016. The enterobacterial genotoxins: cytolethal distending toxin and colibactin. *EcoSal Plus* 7, 1. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0008-2016>. PMID: 27419387.
- Tani, N., Dohi, Y., Onji, Y., Yonemasu, K., 1995. Antiviral activity of trichothecene mycotoxins (deoxynivalenol, fusarenon-X, and nivalenol) against herpes simplex virus types 1 and 2. *Microbiol. Immunol.* 39, 635–637. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1995.tb02254.x>.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E., 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 207–217. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>.
- Terciolo, C., Maresca, M., Pinton, P., Oswald, I.P., 2018. Review article: role of satiety hormones in anorexia induction by Trichothecene mycotoxins. *Food Chem. Toxicol.* 121, 701–714. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.034>.
- Tomasetti, C., Vogelstein, B., 2015. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* 6217, 78–81. <https://doi.org/10.1126/science.1260825>.
- Tronnet, S., Oswald, E., 2018. Quantification of colibactin-associated genotoxicity in HeLa cells by in cell western (ICW) using γ -H2AX as a marker. *Bio Protoc* 8, e2771. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2771>.
- Van Der Fels-Klerx, H.J., Liu, C., Battilani, P., 2016. Modelling climate change impacts on mycotoxin contamination. *World Mycotoxin J.* 5, 717–726. <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2066>.
- Varga, E., Wiesenberger, G., Hametner, C., Ward, T.J., Dong, Y., Schöfbeck, D., McCormick, S., Broz, K., Stückler, R., Schuhmacher, R., et al., 2015. New tricks of an old enemy: isolates of *Fusarium graminearum* produce a type A trichothecene mycotoxin. *Environ. Microbiol.* 17, 2588–2600. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12718>.
- Varga, E., Wiesenberger, G., Woelflingseder, L., Twaruschek, K., Hametner, C., Vaclaviková, M., Malachová, A., Marko, D., Berthiller, F., Adam, G., 2018. Less-toxic rearrangement products of NX-toxins are formed during storage and food processing. *Toxicol. Lett.* 284, 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.12.016>.
- Vignard, J., Mirey, G., Salles, B., 2013. Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: a direct and indirect lighting up. *Radiother. Oncol.* 108, 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.06.013>.
- Wang, W., Zhu, Y., Abraham, N., Li, X.Z., Kimber, M., Zhou, T., 2021. The ribosome-binding mode of trichothecene mycotoxins rationalizes their structure—activity relationships. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1604. <https://doi.org/10.3390/ijms22041604>.
- Weaver, G.A., Kurtz, H.J., Bates, F.Y., Mirocha, C.J., Behrens, J.C., Hagler, W.M., 1981. Diacetoxyscirpenol toxicity in pigs. *Res. Vet. Sci.* 31, 131–135. [https://doi.org/10.1016/S00345288\(18\)32480-9](https://doi.org/10.1016/S00345288(18)32480-9).
- Wu, Q., Dohnal, V., Kuca, K., Yuan, Z., 2013. Trichothecenes: structure-toxic activity relationships. *Curr. Drug Metabol.* 14, 641–660. <https://doi.org/10.2174/1389200211314060002>.
- Wyatt, R.D., Hamilton, P.B., Burmeister, H.R., 1973. The effects of T-2 toxin in broiler chickens. *Poultry Sci.* 52, 1853–1859. <https://doi.org/10.3382/ps.0521853>.
- Yang, G.H., Jarvis, B.B., Chung, Y.J., Pestka, J.J., 2000. Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p38 MAPK, and SAPK/JNK activation. *Tox. appl. pharmacol.* 164, 149–160. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8888>.
- Yang, Y., Gharaibeh, R.Z., Newsome, R.C., Jobin, C., 2020. Amending microbiota by targeting intestinal inflammation with TNF blockade attenuates development of colorectal cancer. *Nat. Can. (Que.)* 7, 723–734. <https://doi.org/10.1038/s43018-020-0078-7>.
- Zhou, H.R., He, K., Landgraf, J., Pan, X., Pestka, J.J., 2014. Direct activation of ribosome-associated double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) by deoxynivalenol, anisomycin and ricin: a new model for ribotoxic stress response induction. *Toxins* 6, 3406–3425. <https://doi.org/10.3390/toxins6123406>.

Supplementary material for :**“A novel toxic effect of foodborne trichothecenes : the exacerbation of genotoxicity”**

Marion Garofalo^{a,b}, Delphine Payros^{a,b}, Marie Penary^b, Eric Oswald^{b,c}, Jean-Philippe Nougayrède^{b,T}, Isabelle P. Oswald^{a,T*}.

^aToxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

^bIRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRAE, ENVT, UPS, Toulouse, France

^cCHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service de Bactériologie-Hygiène, Toulouse, France

^TCo senior authors

*Corresponding author : isabelle.oswald@inrae.fr ;

Keywords : trichothecenes ; genotoxins ; colibactin ; DNA damage.

Supplementary methods 1 :

Immunofluorescence staining. Immunofluorescence staining of 53BP1 and pRPA32 was performed as previously described (Fernandez-Vidal *et al.*, 2019). After treatment, cells were pre-extracted with 0.5% Triton X-100 for 5 minutes on ice. Then the cells were fixed with 4% formaldehyde, and permeabilized for 5 minutes with 0.5% Triton X-100. Cells were blocked overnight at 4°C in blocking solution (IGEPAL 0.1% ; bovine serum albumin 3% ; PBS). Cells were incubated with rabbit polyclonal antibody anti 53BP1 (Novus Biologicals NB100-304 ; 1 :1000) or rabbit polyclonal antibody anti phospho(S33)-RPA32 (Bethyl A300-246A ; 1 :1000) diluted in blocking solution for 1 h at room temperature. Following washing in IGEPAL 0.1% PBS, cells were incubated for 45 min in the dark at room temperature with anti-rabbit AlexaFluor 568 diluted 1 :800 in IGEPAL 0.1% PBS. After washing with IGEPAL 0.1% PBS, the slides were mounted in Fluoroshield containing DAPI (Sigma-Aldrich) and examined with a Zeiss LSM 710 confocal microscope.

Supplementary methods 2 :

***In vitro* crosslinking assay and bacterial load analysis.** To examine colibactin production by the bacteria, a DNA crosslinking assay was performed as previously described (Bossuet-Greif *et al.*, 2018). Briefly, 400 ng linear DNA was exposed to 1.5×10^6 bacteria in 100 μ l infection medium in the presence of TCT or DMSO vehicle. After 4 h at 37°C, bacteria were pelleted, plated on LB agar plates, and enumerated. The DNA was purified from the culture supernatant using the Qiagen QIAquick PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany). Purified DNA was loaded on a denaturing agarose gel (pH 8) and electrophoresis was carried for 45 min at 25V followed by 2 h 30 min at 50V. After gel neutralization, DNA was stained with Gel Red (Biotium, San Francisco, USA) and visualized in a Bio-Rad Chemidoc XRS system. The percentage of crosslinked DNA was quantified by using the FIJI software (<https://imagej.net/Fiji>).

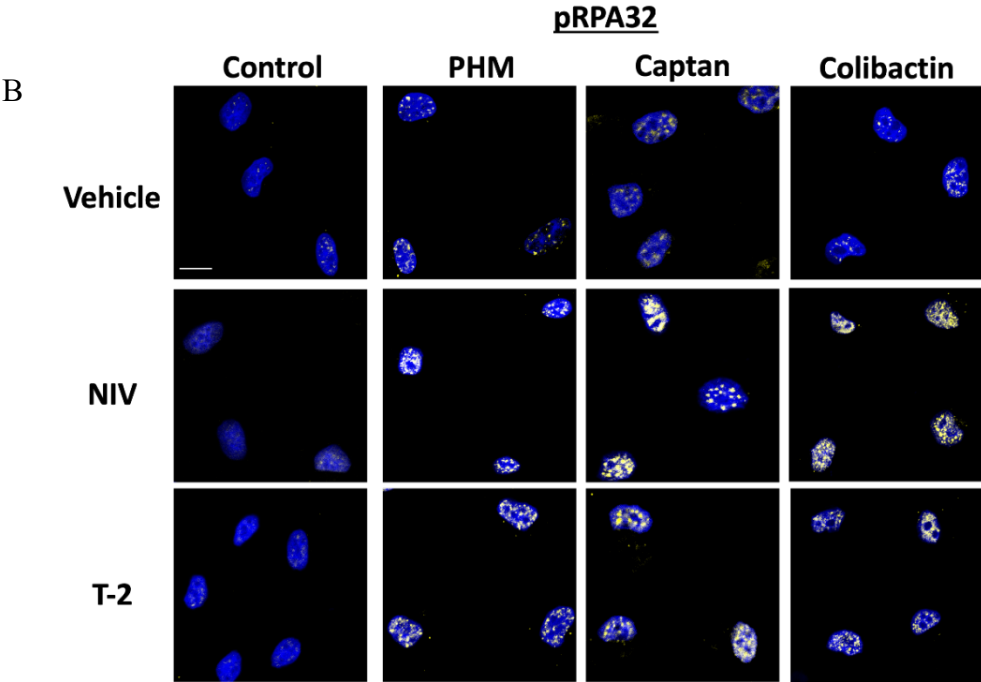
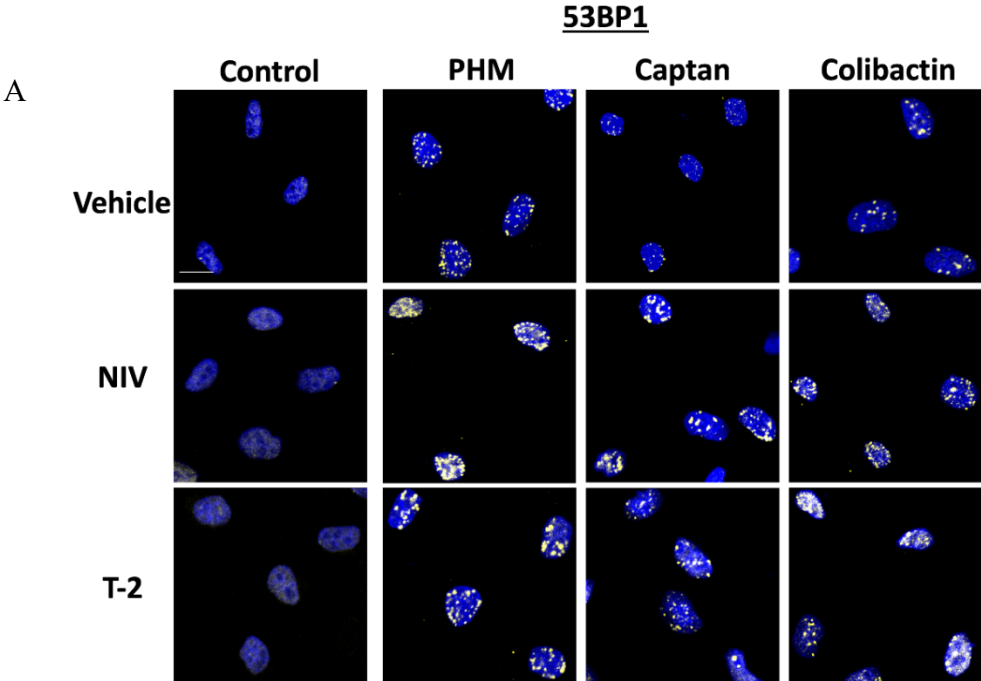
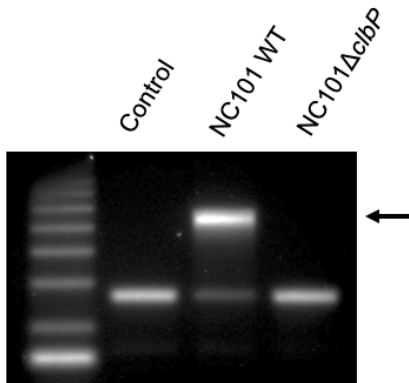
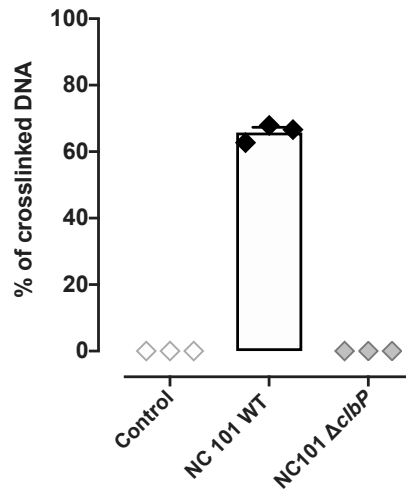


Figure S1 : TCT exacerbate the formation of 53BP1 and pRPA32 foci caused by phleomycin, captan and colibactin. For captan and phleomycin, non-transformed rat intestinal epithelial IEC-6 cells were treated for 4 h with 3 μ M NIV, 10 nM T-2 or DMSO vehicle combined with 5 μ M captan or 3 μ M phleomycin. For colibactin, cells were co-treated for 4h with the live colibactin-producing bacteria combined with the above doses of TCT, rinsed and re-incubated for 4h hours with the TCT alone and gentamicin to kill the remaining bacteria. Then, 53BP1 (panel A) and pRPA32 (panel B) were examined by immunofluorescence. Representative photos. Scale bar = 10 μ m.

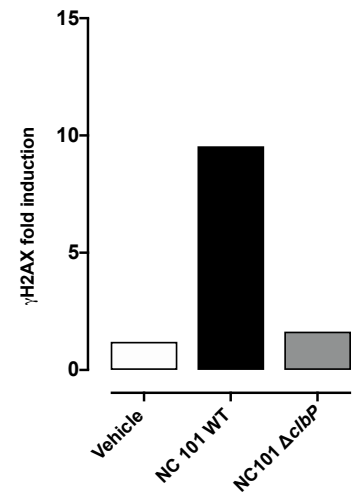
A



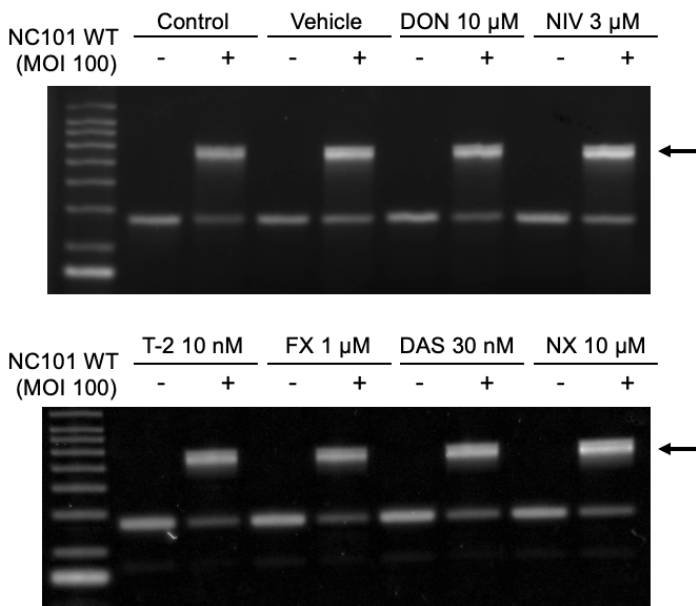
B



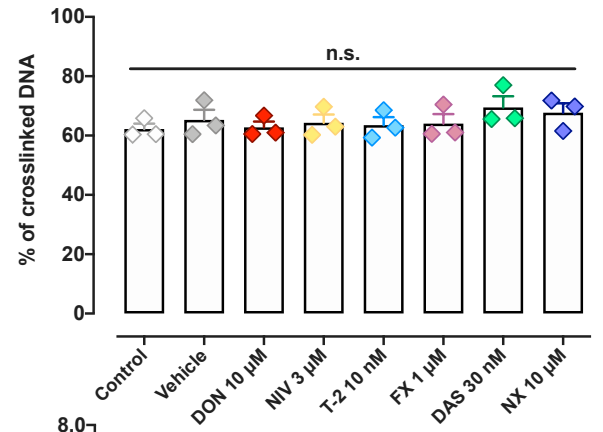
C



D



E



F

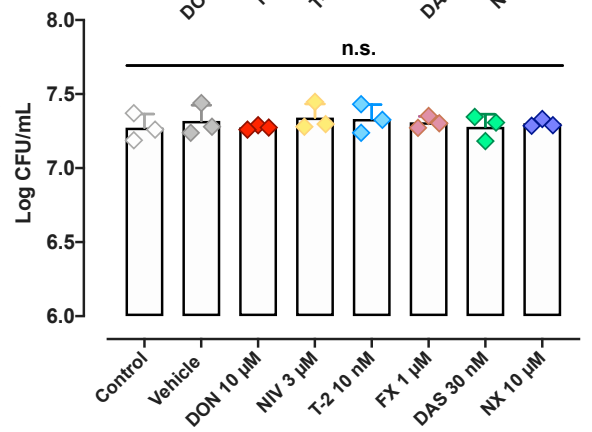


Figure S2 : TCT do not impact colibactin production and bacterial growth. A, B : *E. coli* NC101 wild-type (WT) or $\Delta clbP$ (MOI 100) were grown for 3.5 h, and then linearized DNA was added and incubated for 30 min. DNA was purified and analysed by denaturing gel electrophoresis, and the percentage of crosslinked DNA (arrow) was quantified by image analysis. C : Non-transformed rat intestinal epithelial IEC-6 cells were infected for 4 h with the producing-colibactin *E. coli* strain NC101 wild-type (WT) or with the colibactin-deficient strain NC101 $\Delta clbP$ (MOI 10). Then, H2AX phosphorylation levels were quantified by In-Cell-Western. D, E : colibactin production was measured as in panel A in presence of TCT. F : after the interaction between bacteria TCT and DNA, the bacteria were counted by serial dilution and plating. After an overnight incubation, Colony Forming Units (CFU) were enumerated. All the data are expressed as mean \pm SEM (3 independent experiments). All P-values are calculated using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison. n.s : not significant.

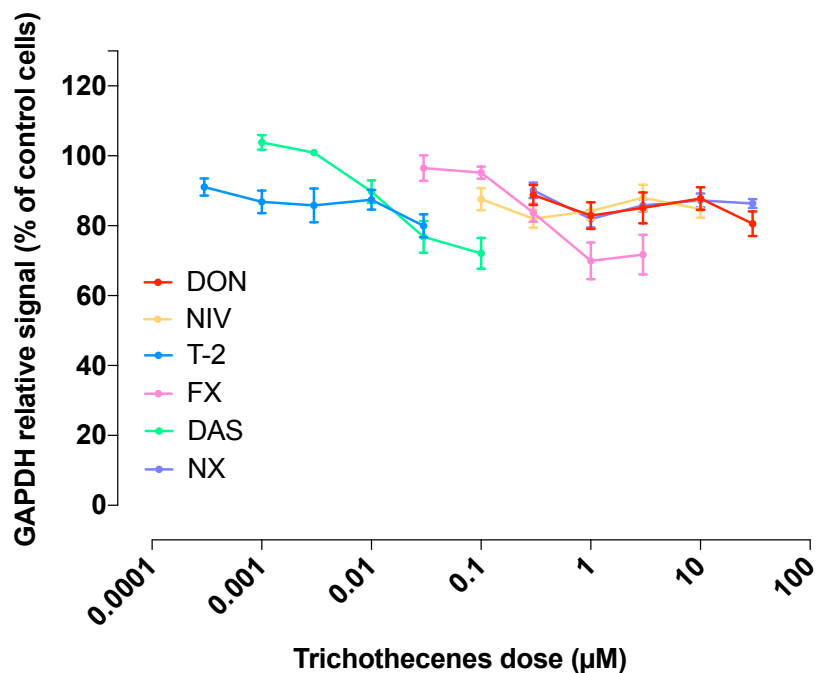


Figure S3 : Non-transformed rat intestinal epithelial IEC-6 cells were treated for 4 hours with various concentrations of DON (red), NIV (yellow), T-2 (blue), FX (pink), DAS (green), or NX (purple). GAPDH levels were measured with an anti-GAPDH antibody by In-Cell-Western. All the data are expressed as mean \pm SEM (4 independent experiments).

Chapitre III

Interaction entre génotoxines ribotoxines : application à des toxines bactériennes

A. Introduction

Les résultats obtenus lors de cette thèse démontrent l'existence d'un effet « cocktail » entre ribotoxines et génotoxines. Notamment, les travaux présentés dans ce travail ont démontré que diverses ribotoxines exacerbent la génotoxicité de diverses génotoxines.

Comme décrit dans la partie introductive de ce manuscrit, de nombreuses souches bactériennes sont capables de produire des génotoxines, comme la génotoxine CDT. De la même manière, certaines bactéries produisent des ribotoxines. La Shiga toxine (Stx) est une ribotoxine bactérienne ciblant les cellules endothéliales, responsable de diarrhées sanglantes, de vomissements, et du syndrome hémolytique et urémique (SHU) chez les enfants.   la lumière des résultats présentés dans cette thèse, on peut proposer que la ribotoxine Stx pourrait exacerber la génotoxicité induite par la génotoxine CDT. De manière intéressante, certains *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC), qui produisent la ribotoxine Stx, produisent aussi la génotoxine CDT. La synergie entre ces deux toxines pourrait avoir un effet délétère sur l'hôte en augmentant la pathogénicité de ces souches bactériennes. Finalement, la démonstration d'une telle hypothèse permettrait de renforcer l'idée selon laquelle le stress ribosomal, phénomène universel qui englobe toutes les réponses cellulaires à un empoisonnement du ribosome, est impliqué dans l'exacerbation de la génotoxicité.

1. La Cytotoxic Distending Toxin (CDT)

La toxine CDT est une génotoxine bactérienne produite notamment par des bactéries de l'espèce *E. coli*. Constituée de 3 sous-unités, dont une active, la toxine CDT induit des cassures de l'ADN dans les cellules eucaryotes. Son mode d'action et ses modes de sécrétion ont été décrits dans l'introduction de ce manuscrit.

2. La Shiga toxine (Stx)

Les toxines de la famille des Shiga toxines (13 sous-types décrits à ce jour) (**Annexe II**) sont de puissantes ribotoxines qui induisent le clivage enzymatique de l'ARN ribosomal eucaryote. Leur mode de sécrétion et de transport, similaires à ceux décrits pour la toxine CDT, ainsi que leur mécanisme d'action sont présentés en **figure 16**. Les détails concernant la structure et le mode d'action des toxines Stx ont été décrits dans la revue introductive de cette thèse (**Garofalo *et al.*, soumis**).

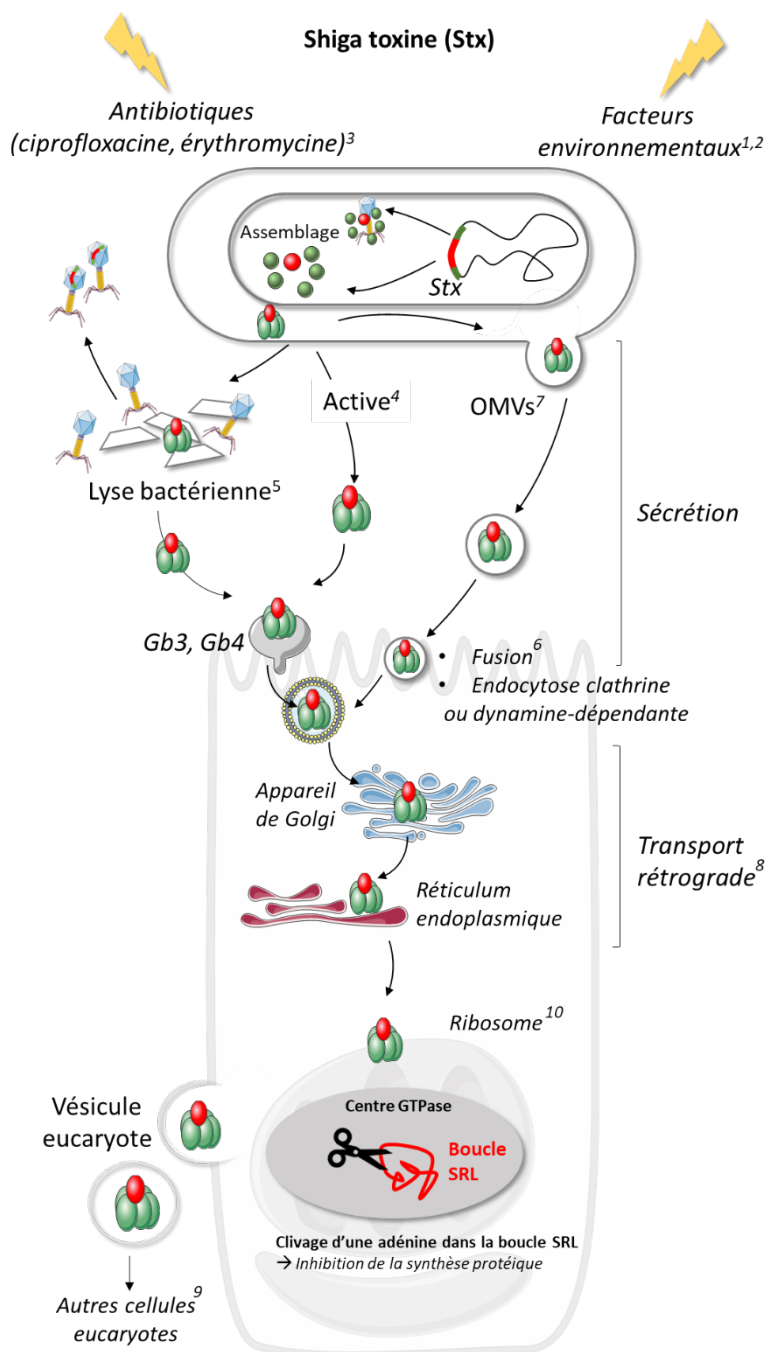


Figure 16 : production, internalisation et mode d'action de la toxine Stx. Références : 1 : McBroom *et al.*, 2007 ; 2 : Maredia *et al.*, 2012 ; 3 : McGannon *et al.*, 2010 ; 4 : Fogg *et al.*, 2012 ; 5 : Shimizu *et al.*, 2009 ; 6 : Bielaszewska *et al.*, 2017 ; 7 : Kunsmann *et al.*, 2015 ; 8 : Sandvig *et al.*, 2010 ; 9 : Ståhl *et al.*, 2015 ; 10 : Tumer et Li, 2012.

B. Objectif

Sachant que plusieurs ribotoxines et génotoxines sont capables d'interagir entre elles de manière synergique, l'objectif de ce chapitre était de déterminer si cette interaction est applicable à CDT et Stx, deux toxines bactériennes aux modes d'actions bien particuliers susceptibles d'être co-produites par une même souche bactérienne.

C. Matériel et méthodes

Toxines. L'étoposide et le DON ont été achetés chez Sigma-Aldrich et préparés comme précédemment (Garofalo *et al.*, 2022, 2023). La toxine CDT-I, sous-type le mieux référencé de CDT (Taieb *et al.*, 2016), a été utilisée dans cette étude. CDT-I a été produite à partir du surnageant de culture de la souche *E. coli* DH5- α porteuse du plasmide pGEM CDT-I (carbR). La souche DH5- α pGEM CDT-I ABmC (carbR), qui exprime une forme de CDT-I dont la sous-unité B a été inactivée, a été utilisée en contrôle. Pour chaque souche, une pré-culture en milieu LB a été réalisée sur une nuit à 37°C sous agitation, en présence de l'antibiotique adapté. 25 mL de milieu TB ont étéensemencés au 1/100 avec chaque pré-culture, puis incubés 24h à 37°C sous agitation. Les cultures ont été centrifugées 20 minutes à 7000g, puis les surnageants ont été filtrés sur 0.22 μ M. La toxine Stx2a a été purifiée à partir d'un surnageant de culture de la souche *E. coli* C600 EDL933 (exprimant le bactériophage EDL933 porteur de la toxine Stx) induite sur une nuit à la ciprofloxacine 30 ng/mL. L'extrait contrôle a été obtenu à partir d'un surnageant de culture de la souche *E. coli* C600 n'exprimant pas le bactériophage EDL933. Après pré-culture puis culture sur une nuit en milieu LB, les cultures ont été centrifugées, et les surnageants de culture ont été concentrés 20 fois sur colonnes Vivaspin (10 kDa).

Culture et traitement des cellules eucaryotes. Les cellules HeLa, modèle décrit pour exprimer les récepteurs glycosphingolipid globotriaosylceramide (Gb3) nécessaires à l'activité de la toxine Stx (Shin *et al.*, 2009) classiquement utilisé pour sa sensibilité aux dommages à l'ADN induits par CDT (Taieb *et al.*, 2016), ont été utilisées dans cette étude. Les cellules ont été cultivées en DMEM GlutaMAX 10% sérum de veau fœtal, 1% d'acides aminés non essentiels, puisensemencées en plaques 96 transparentes avant la coloration au bleu de méthylène ou à fond noirs avant l'In-Cell-Western.

Après 24h d'incubation à 37°C 5% CO₂, les cellules ont été traitées avec les toxines et incubées durant 72h pour la coloration au bleu de méthylène ou 6h pour l'évaluation de la génotoxicité.

Coloration au bleu de méthylène. La coloration au bleu de méthylène a été effectuée comme décrit précédemment (Bossuet-Greif *et al.*, 2017). En bref, 5 000 cellules par puits ont été traitées avec les toxines d'intérêt et incubées pendant 72h. Après fixation, les cellules ont été colorées au bleu de méthylène et observées au microscope optique (x20). Le cas échéant, le bleu de méthylène a ensuite été extrait à l'acide chloridrique, puis la densité optique à 660 nm a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque.

In-Cell-Western. L'In-Cell-Western permettant la détection du marqueur de dommages à l'ADN γ H2AX a été réalisé comme décrit précédemment (Garofalo *et al.*, 2022 ; 2023).

D. Résultats

Validation de l'activité de la toxine CDT-I. L'induction de sénescence étant un marqueur de l'activité de la toxine CDT, ce phénotype a été utilisé pour vérifier la bonne extraction et l'activité de la toxine. Les cellules HeLa traitées pendant 72h avec l'extrait issu de la souche DH5- α -pGEM CDT-I ont montré le phénotype de sénescence cellulaire, contrairement à celles traitées avec l'extrait issu de la souche contrôle. Ce résultat confirme ainsi l'extraction et l'activité de la toxine CDT (**figure 17A**). L'effet de distension cellulaire caractéristique de CDT, observé à des temps d'incubation tardifs, est la conséquence de l'action génotoxique de la toxine (Taieb *et al.*, 2016). La génotoxicité des extraits a donc été évaluée après 6h d'incubation. Comme le montre la **figure 17B**, le surnageant de culture extrait de la souche contrôle DH5- α -pGEM CDT-I ABmC n'est pas génotoxique, contrairement au surnageant de la souche DH5- α -pGEM CDT-I. De ce fait, l'extrait purifié est bien génotoxique, et cet effet est spécifique de la toxine CDT-I.

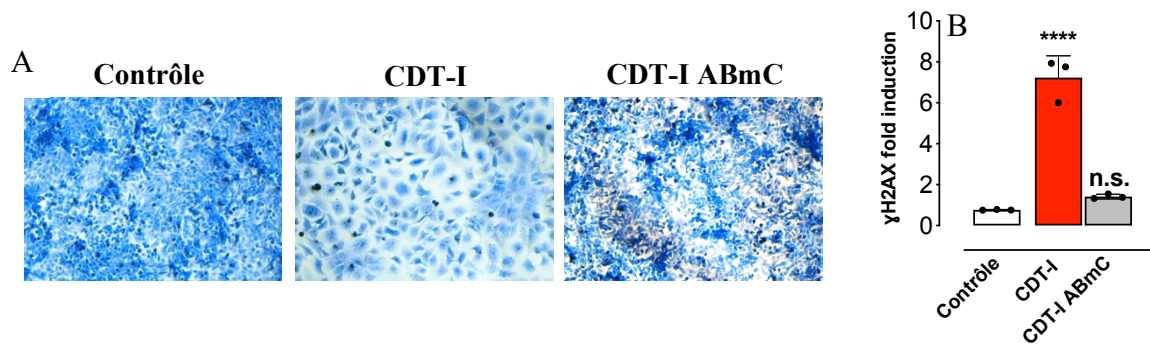


Figure 17 : Activité spécifique de la toxine CDT-I. A : des cellules HeLa ont été traitées pendant 72h heures avec du surnageant de culture extrait des souches DH5- α -pGEM CDT-I et DH5- α -pGEM CDT-I ABmC, puis colorées au bleu de méthylène et observées au microscope 20x. B : des cellules HeLa ont été traitées pendant 6h heures avec du surnageant de culture extrait des souches DH5- α -pGEM CDT-I et DH5- α -pGEM CDT-I ABmC, puis les niveaux du marqueur de génotoxicité γ H2AX ont été mesurés par In-Cell Western. Test statistique : ANOVA à un facteur, comparaison par rapport au contrôle, ****= $p < 0.0001$; n.s.= non significatif.

Le DON exacerbe l'effet de CDT-I. Pour tester l'interaction entre CDT et Stx, nous avons d'abord cherché à savoir si l'effet de la génotoxine CDT était susceptible d'être exacerbé par une ribotoxine. En effet, la toxine CDT est une toxine tripartite à structure moléculaire complexe, en comparaison avec les autres génotoxines utilisées dans cette thèse. De plus, l'activité CDT nécessite l'interaction avec un récepteur, ainsi que l'emprunt du transport rétrograde, autant de facteurs qui pourraient être impactés par la présence d'une ribotoxine. Pour répondre à cette problématique, nous avons donc commencé cette partie de l'étude en testant l'interaction entre CDT et une ribotoxine bien connue, le DON. Comme le montre la **figure 18**, le DON exacerbe de manière dose-dépendante la génotoxicité induite par CDT-I, sans induire de cytotoxicité massive.

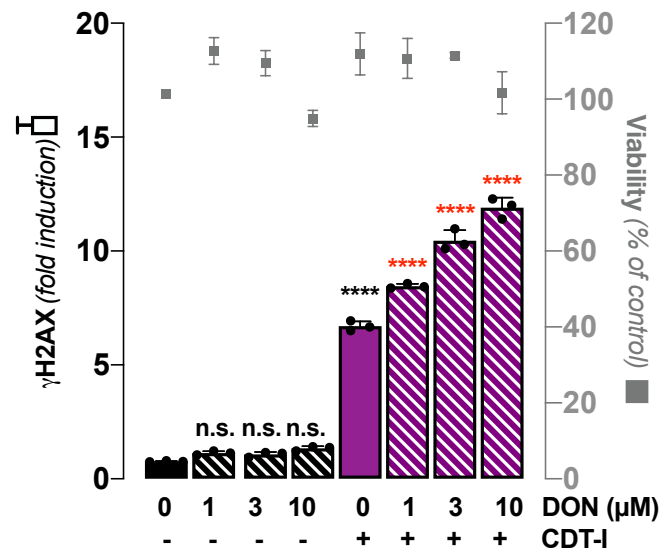


Figure 18 : Génotoxicité de CDT-I et son exacerbation par le DON. A : des cellules HeLa ont été traitées pendant 6 heures avec 1, 3 ou 10 μM de DON en combinaison ou non avec CDT-I (1/100). Les dommages à l'ADN ont été évalués en quantifiant les niveaux de phosphorylation de H2AX par In-Cell Western (barres). Test statistique : ANOVA à un facteur, annotations noires=comparaison par rapport au contrôle, annotations rouges=comparaison par rapport à CDT seule. ****= $p < 0.0001$; n.s.=non significatif. La viabilité cellulaire a été calculée par mesure du marquage RedDot2 (carrés).

Validation de l'activité de la toxine Stx. Pour vérifier l'activité de la toxine Stx, la cytotoxicité, première conséquence de l'intoxication à Stx, a été évaluée sur des cellules HeLa traitées durant 72h, par quantification de la biomasse de cellules traitées par Stx et colorées au bleu de méthylène. Comme le montre la **figure 19**, l'extrait issu de la souche C600-EDL933 (porteuse du bactériophage Stx) induit une forte cytotoxicité dose-dépendante, contrairement à l'extrait contrôle issu de la souche n'exprimant pas le bactériophage EDL933.

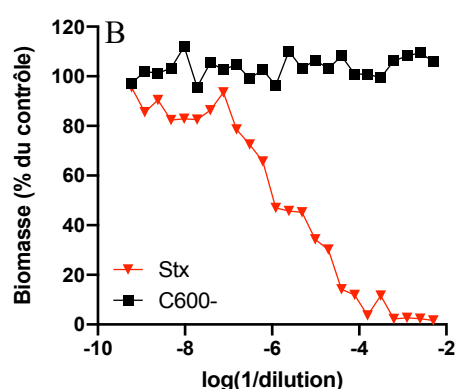


Figure 19 : Activité spécifique de la toxine Stx.

A : des cellules HeLa ont été traitées pendant 72h heures avec du surnageant de culture concentré extrait des souches exprimant ou non le bactériophage porteur de Stx, puis colorées au bleu de méthylène et observées au microscope 20x. B : le bleu de méthylène a été extrait puis la densité optique à 660 nm (relative à la biomasse cellulaire) a été mesurée.

Stx exacerbe l'effet d'une génotoxine de référence. De la même manière que CDT, la toxine Stx est très différente des ribotoxines utilisées dans les deux études expérimentales présentées dans ce manuscrit. D'une part, elle interagit avec les récepteurs Gb3 et transite *via* le transport rétrograde. D'autre part, elle exerce une activité de clivage enzymatique au niveau l'ARNr, par opposition avec la gêne stérique provoquée par les trichothécènes, le cycloheximide, ou l'anisomycine. De ce fait, Stx pourrait infirmer l'hypothèse de l'existence d'un effet « universel ». Pour connaître l'impact de Stx sur la génotoxicité, nous avons donc d'abord utilisé une génotoxine modèle commercialisable et bien connue, l'étoposide. Comme le montre la **figure 20**, la ribotoxine Stx, qui n'est pas génotoxique lorsqu'elle est considérée seule, exacerbe l'effet de l'étoposide de manière dose-dépendante.

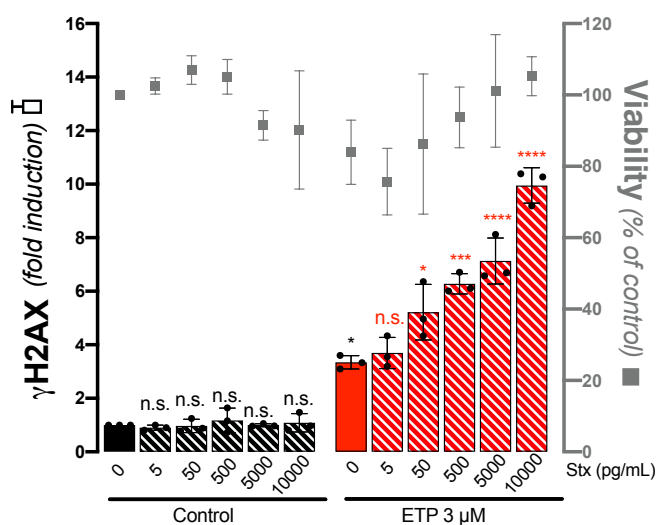


Figure 20 : Génotoxicité de l'étoposide et son exacerbation par la toxine Stx. A : des cellules HeLa ont été traitées pendant 6 heures avec différentes concentrations de Stx en combinaison avec 3 μ M d'étoposide (ETP). Les dommages à l'ADN ont été évalués en quantifiant les niveaux de phosphorylation de H2AX par In-Cell Western (barres). Test statistique : ANOVA à un facteur, annotations noires=comparaison par rapport au contrôle, annotations rouges=comparaison par rapport à CDT seule. *= $p < 0.1$; **= $p < 0.001$; ****= $p < 0.0001$; n.s.=non significatif. La viabilité cellulaire a été calculée par mesure du marquage RedDot2 (carrés).

Ensemble, ces phases expérimentales préliminaires ont donc permis de :

- Purifier les deux toxines d'intérêt et confirmer leurs activités respectives,
- Démontrer que l'effet de la génotoxine CDT est susceptible d'être augmenté par une ribotoxine, et que la ribotoxine Stx peut augmenter l'effet d'une génotoxine,
- Définir les conditions expérimentales (fenêtre d'observation adaptée) pour tester l'interaction entre les deux toxines d'intérêt, CDT et Stx.

Stx exacerbe l'effet de la toxine CDT. Après avoir validé l'activité de chaque toxine d'intérêt, puis fourni la preuve de concept d'une possible interaction entre elles, CDT, Stx, et leurs contrôles respectifs, ont finalement été testés en interaction. Comme le montre la **figure 21**, Stx exacerbe la génotoxicité induite par la génotoxine CDT-I, de manière dose-réponse.

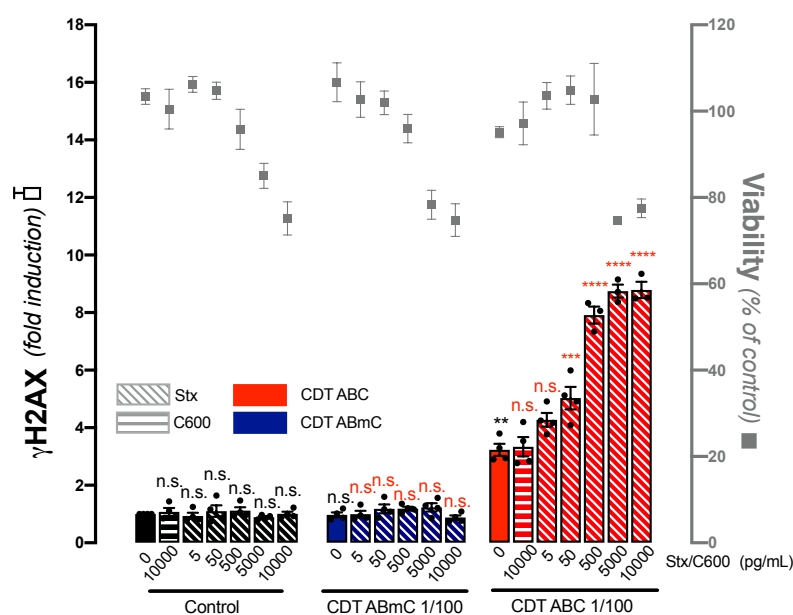


Figure 21 : Génotoxicité de CDT-I et son exacerbation par la toxine Stx. A : des cellules HeLa ont été traitées pendant 6 heures avec la toxine Stx ou son contrôle C600, en combinaison ou non avec la toxine CDT-I ou sa forme inactive CDT ABmC. Les dommages à l'ADN ont été évalués en quantifiant les niveaux de phosphorylation de H2AX par In-Cell Western (barres). Test statistique : ANOVA à un facteur, annotations noires=comparaison par rapport au contrôle, annotations rouges=comparaison par rapport à CDT seule. **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$; ****= $p < 0.0001$; n.s.=non significatif. La viabilité cellulaire a été calculée par mesure du marquage RedDot2 (carrés).

E. Discussion

1. Interaction CDT/DON

Cette étude montre que le DON augmente l'effet de la génotoxine CDT. De la même manière que la colibactine, la toxine CDT est exprimée par des espèces bactériennes du microbiote intestinal, et est donc susceptible d'être produite *in vivo* au niveau intestinal. Une co-exposition entre le DON provenant de l'alimentation et CDT au niveau intestinal est donc concevable. Après une exposition chronique aux dommages à l'ADN causés par CDT, les cellules intoxiquées accumulent des anomalies chromosomiques, menant à l'apparition de phénotypes malins (Guidi *et al.*, 2013). De plus, l'implication de l'activité génotoxique de CDT dans la carcinogénèse induite par *Campylobacter jejuni* a été démontrée dans un modèle murin (He *et al.*, 2018). Cela suggère que l'augmentation de la génotoxicité induite par le DON pourrait non seulement favoriser la cancérogénèse induite par la colibactine (Payros *et al.*, 2017 ; Garofalo *et al.*, 2023), mais aussi celle d'une autre génotoxine bactérienne, CDT.

De manière intéressante, une étude suggère que le DON favorise la colonisation de souches de *C. jejuni* au niveau intestinal (Rhuneau *et al.*, 2020). On peut proposer suggérer que l'augmentation de l'activité d'un des facteurs de virulence majeurs de *C. jejuni*, CDT, est impliquée dans cet effet du DON.

2. Shiga toxine et chimiothérapie

L'étoposide, tout comme d'autres génotoxines (cisplatine, oxaliplatine, molécules de la famille des bléomycines, 5-fluorouracil (5-FU) ...), sont à la base de la majorité des traitements anti-cancéreux (Swift *et al.*, 2014). La synergie entre l'étoposide et la toxine Stx décrite dans cette étude pose question quant à l'implication de la toxine Stx en chimiothérapie, dans le cadre d'une infection à EHEC, mais aussi dans un cadre thérapeutique.

i. Infection à EHEC chez les patients sous chimiothérapie

Les contaminations à EHEC se font principalement par l'alimentation (fromages au lait cru, viandes mal cuites...) (Nguyen *et al.*, 2012). De plus, ces souches peuvent représenter une cause courante d'intoxication alimentaire au sein même des hôpitaux. Notamment, des problèmes de cuisson ou de stockage des aliments dans les cuisines collectives hospitalières peuvent favoriser le développement de ces souches (Ranjbar *et al.*, 2017). Les patients sous chimiothérapie pourraient donc être exposés à la toxine Stx *via* leur alimentation, à l'extérieur comme à l'intérieur de l'hôpital. De plus, l'affaiblissement du système immunitaire, effet secondaire majeur de la chimiothérapie, pousse parfois les médecins à prescrire aux patients sous chimiothérapie des traitements prophylactiques à base d'antibiotiques pour prévenir les infections bactériennes. Or, certains antibiotiques comme la ciprofloxacine, parfois utilisée dans ce cadre (Garnica *et al.*, 2013), peuvent induire la lyse de bactéries productrices de Stx et l'expression du gène *Stx*, libérant ainsi la toxine dans l'organisme (Zhang *et al.*, 2000) (**figure 16**). Les résultats de la présente étude suggèrent que Stx augmente l'effet d'au moins un agent chimiothérapeutique. On peut donc proposer qu'un patient sous chimiothérapie exposé à une souche bactérienne productrice de Stx pourrait voir l'activité de son traitement augmentée. On peut alors proposer la mise en place des contrôles réguliers pour détecter la présence d'EHEC dans les selles des patients sous chimiothérapie, pour envisager l'adaptation des doses thérapeutiques chez les patients porteurs de ces souches.

ii. *Exploiter l'interaction entre Stx et chimio thérapeutiques pour le traitement du cancer*

Cette étude ouvre également à des applications biotechnologiques dans un cadre thérapeutique. En effet, plusieurs travaux proposent que les cellules cancéreuses expriment des quantités importantes du récepteur de la toxine Stx, Gb3. L'utilisation de Stx a d'ailleurs été proposée pour le traitement de tumeurs (pour une revue, voir Engedal *et al.*, 2011). On peut donc imaginer qu'une injection ciblée, en intra tumoral, de la toxine Stx (sous sa forme libre ou encapsidée dans les OMVs), en complément d'un traitement chimio thérapeutique à base de génotoxines, pourrait améliorer l'efficacité de la génotoxine au niveau tumoral.

3. Rôle de l'interaction CDT/Stx dans la virulence bactérienne

Les bactéries pathogènes expriment fréquemment un large répertoire de facteurs de virulence, qui représentent un coût important en énergie pour la bactérie. Si ces facteurs de virulence ont été spécifiquement conservés dans l'évolution, c'est donc probablement qu'ils confèrent des avantages à la bactérie. Les avantages de la double production de Stx et CDT ne sont pas décrits, mais la présente étude permet de proposer des hypothèses. En effet, ce travail suggère que ces deux facteurs de virulence peuvent agir de concert. On peut par exemple proposer que cette synergie participe à la virulence bactérienne en favorisant l'affaiblissement des barrières de l'hôte, et notamment de la barrière endothéliale. En effet, l'une des premières cibles des toxines Stx et CDT est l'endothélium, qui compose la barrière entre le système circulatoire et les autres tissus de l'hôte (Scuron *et al.*, 2016 ; Petruzzello-Pellegrini *et al.*, 2013). Ceci suggère que les deux toxines pourraient collaborer pour pirater les fonctions des cellules endothéliales et affaiblir l'hôte pour favoriser la persistance bactérienne. Par exemple, l'affaiblissement de l'endothélium pourrait favoriser le passage des toxines à travers la barrière endothéliale, et donc leur dissémination dans les tissus. En particulier, cela permettrait aux deux toxines de rejoindre et cibler les tissus immunitaires qui participent à la lutte contre l'infection. De plus, l'idée d'une action simultanée des deux toxines est renforcée par l'existence de modes de sécrétion communs entre les deux toxines (McBroom *et al.*, 2007). Ceci laisse penser que les deux toxines sont susceptibles d'être relarguées simultanément par la bactérie productrice, appuyant ainsi l'hypothèse d'un effet synergique sur la virulence. Pour approfondir ces hypothèses, il serait nécessaire de tester l'interaction entre Stx et CDT-V, seul sous-type de CDT co-produit avec la toxine Stx, sur différents types cellulaires. Or, ce travail n'a pas permis de purifier de manière efficace ce sous-type de CDT.

4. Rôle de Stx dans la cancérogénèse induite par CDT

Plusieurs évidences suggèrent que la toxine CDT joue un rôle dans le développement de cancers colorectaux. En effet, des *E. coli* producteurs de CDT ont été détectés chez 15.8% des patients atteints d'un cancer colorectal, alors qu'aucune souche productrice de CDT n'a été détectée dans le groupe contrôle. De plus, les souches productrices de CDT ont été retrouvées à proximité de tumeurs chez les patients atteints de cancers colorectaux (Buc *et al.*, 2013). Enfin, dans un modèle murin, la toxine CDT, par l'intermédiaire de la génotoxicité de sa sous-unité active CdtB, favorise la tumorigénèse intestinale (Ge *et al.*, 2017). A hautes doses, la toxine Stx est fortement cytotoxique vis-à-vis de nombreuses lignées cellulaires exprimant son récepteur Gb3. En revanche, à des doses sublétales, la toxine Stx induit des effets plus subtils, comme l'exacerbation de la génotoxicité. Aux vues du rôle prédominant des lésions à l'ADN dans l'induction de cancers, on peut donc suggérer que les souches bactériennes exprimant à la fois les deux toxines ont un potentiel carcinogène augmenté par rapport à des souches produisant les toxines individuellement. De plus, aux vues de la capacité des bactériophages porteurs du gène *Stx* à subsister dans l'intestin et dans les fécès, même après l'infection (Allué-Guardia *et al.*, 2014), la toxine Stx pourrait être transmise à d'autres bactéries exprimant CDT, et ainsi conférer ce haut potentiel carcinogène à de nouvelles souches bactériennes. Pour finir, il existe d'importantes variabilités inter-individuelles dans la susceptibilité aux génotoxines (Jenkins *et al.*, 2010), qui peuvent être dues à des associations complexes de facteurs encore mal décrits. On peut suggérer qu'une exposition de bas bruit à Stx est l'un de ces facteurs. Ainsi, un sujet exposé à de faibles doses de Stx pourrait être plus à risque de cancérogénèse.

F. Conclusion

Pour conclure, ces données ajoutent la toxine bactérienne Stx à la liste des ribotoxines exacerbant l'effet de génotoxines. Ce nouvel effet de Stx ouvre à plusieurs pistes de réflexion. D'abord, ce chapitre suggère que la toxine CDT pourrait favoriser la pathogénicité des EHEC. Ensuite, comme les EHEC se transmettent principalement au travers de l'alimentation, ces travaux rappellent l'importance de l'hygiène des aliments, notamment dans les services hospitaliers. Par ailleurs, cette étude ouvre à de nouvelles pistes thérapeutiques quant à l'utilisation de Stx en chimiothérapie. Pour finir, cette étude étend à nouveau le phénotype décrit pendant cette thèse, qui passe d'un effet du DON sur la génotoxicité de la colibactine, à une large interaction entre ribotoxines et génotoxines, quel que soit leur origine et leur mode d'action.

**DISCUSSION GENERALE ET
PERSPECTIVES**

I. Discussion générale

Le concept d'« exposome » décrit en introduction de ce manuscrit souligne que les expositions multiples sont la règle et non l'exception. En effet, l'Homme n'est jamais exposé à un seul contaminant. Dans ce contexte, ce projet de thèse s'est intéressé à l'interaction entre ribotoxines et génotoxines, qu'elles soient d'origine bactérienne, alimentaire, ou chimique. En 2017, une première étude menée dans l'équipe a décrit l'existence d'une interaction entre une ribotoxine alimentaire et une génotoxine bactérienne produite par le microbiote. Dans ce travail, nous avons démontré que cette interaction n'est pas spécifique à ces deux toxines, mais s'étend à de multiples génotoxines et ribotoxines de l'exposome.

A. Vers l'évolution des critères d'évaluation de la toxicité des contaminants

Les deux études expérimentales publiées durant cette thèse ont démontré que plusieurs ribotoxines exacerbent l'effet de multiples génotoxines, et ce malgré le fait qu'ils ne soient pas génotoxiques en eux même. Ce résultat rappelle que même si un composé seul n'est pas considéré comme toxique, il est pourtant susceptible d'augmenter l'effet d'autres molécules. En toxicologie, ce phénomène est appelé « synergie ». On désigne une interaction comme « synergique » lorsque la co-exposition aux substances chimiques entraîne des effets toxiques supérieurs à la somme des effets des substances chimiques individuelles. Plus précisément, l'effet observé dans cette thèse est une « potentialisation », ou « modulation positive ». Ces termes décrivent des synergies dans lesquelles une ou plusieurs substances chimiques exacerbent les effets toxiques d'autres substances, mais sans produire cet effet par elles-mêmes (Martin *et al.* 2021). Plusieurs synergies entre contaminants de l'exposome ont déjà été décrites, notamment dans des mixtures de pesticides, de métaux lourds, ou d'antisalissures (peintures contenant des biocides destinés à empêcher les organismes marins de se fixer à la coque des navires) (Cedergreen 2014). A l'avenir, l'évaluation du risque toxicologique devrait se tourner vers une meilleure considération de ces synergies, qui « révèlent » la toxicité de composés considérés « non toxiques » lorsqu'ils sont pris seuls.

1. Synergies et évaluation du risque

Les organismes législateurs, comme l'EFSA, commencent à prendre en compte l'existence de ces synergies entre toxines.

En effet, depuis quelques années, l'EFSA propose et développe de nouvelles méthodes pour l'identification et la caractérisation du risque associé aux mélanges, telles que la « *whole mixture approach* », ou la « *component-based approach* ». Ces méthodes, qui ont déjà été utilisées pour évaluer le risque associé à des mélanges de pesticides, sont complexes, car elles dépendent de nombreux facteurs, tels que la nature des composés présents dans la mixture, la similarité des composés entre eux, ou la stabilité de la mixture dans le temps (EFSA, 2019). La présente étude alerte à nouveau sur l'existence de synergismes toxicologiques, et sur l'importance de généraliser progressivement ce type d'approche pour l'évaluation des risques toxicologiques.

2. Classification du DON par le CIRC

Les effets synergiques mis en lumière lors de cette thèse suggèrent un rôle de l'exposition aux ribotoxines en cancérologie. En effet, les dommages à l'ADN favorisent l'instabilité génomique. L'instabilité génomique, qui inclut des mutations de bases d'ADN, ou encore l'instabilité chromosomique (accumulation d'anomalies chromosomiques), est l'un des plus importants facteurs de risque de développement de cancer. En particulier, si l'une de ces anomalies génétiques a lieu dans un ou plusieurs gènes de la DDR, la protéine associée peut être non fonctionnelle. En cas de niveaux importants de dommages à l'ADN, la DDR mène à l'apoptose, pour préserver l'intégrité du tissu et éviter la transmission du matériel génétique défectueux aux cellules filles. Si la DDR n'est pas optimale, l'apoptose n'a pas lieu et la cellule continue à se diviser malgré un génome instable, menant ainsi à un phénotype malin. Cette étude démontre que les ribotoxines favorisent l'accumulation de dommages à l'ADN induits par des génotoxines auxquelles nous sommes exposés. Ceci suggère que les ribotoxines, et notamment les TCT qui contaminent notre alimentation à hauts niveaux, pourraient exacerber la carcinogénicité de ces génotoxines.

Le CIRC est une agence de recherche sur le cancer de l'Organisation Mondiale de la Santé. Constitué d'experts qui analysent les études expérimentales et épidémiologiques pertinentes, le CIRC évalue le potentiel carcinogène d'un toxique. A la différence de l'EFSA, le CIRC ne prend pas en compte le risque (exposition au toxique), mais uniquement le danger (IARC monographs, préambule). Le CIRC a pour objectif de classer les toxiques dans différents groupes selon leur potentiel carcinogène. Selon les critères du CIRC, le DON n'est « pas classifiable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme » (groupe 3). Pourtant, certaines études *in vitro* suggèrent le contraire.

Par exemple, le DON augmente l'expression des gènes MLL, impliqués dans divers types de cancers, notamment dans les leucémies (Ansari *et al.* 2009). Une autre étude suggère même que le DON pourrait avoir un potentiel génotoxique après une exposition de 24 à 72h de cellules Caco-2, probablement du fait de son pouvoir pro-oxydant (Bony *et al.* 2006). Les travaux présentés dans cette thèse proposent un autre mécanisme en faveur d'un rôle du DON et d'autres TCT dans le développement de cancers : à des temps d'exposition courts, ces molécules ne sont pas génotoxiques, mais augmentent la génotoxicité de composés pro-carcinogènes. Ensemble, ces études suggèrent que le CIRC devrait à l'avenir, envisager de reconsidérer sa classification du DON dans le groupe 3.

B. Vers une adaptation des régimes alimentaires

Nous ne sommes pas égaux face à l'exposition aux toxiques. En effet, certaines populations sont plus exposées aux TCT ou aux génotoxines. De ce fait, on pourrait envisager l'adaptation des régimes alimentaires et/ou la surveillance de l'exposition à ces toxines chez ces populations.

1. Chez les populations les plus exposées aux TCT

Les enfants et les adolescents, par leur faible poids corporel et leurs fortes consommations de produits céréaliers, sont l'exemple typique des populations les plus exposées aux mycotoxines, et notamment au DON. En Europe, les apports journaliers tolérables, fixés à 1 µg/kg de poids corporel/jour pour le DON, sont très souvent dépassés chez les enfants (jusqu'à 2.9 µg/kg de poids corporel/jour) (Knusten *et al.*, 2017). En France, l'étude de Vin *et al.* a démontré que 7.5 à 27% des enfants âgés de 5 mois dépassaient les seuils maximaux recommandés pour le DON (Vin *et al.* 2020). Les personnes végétariennes seraient également un groupe à haut risque d'exposition au DON, en raison de leur consommation élevée de céréales. En effet, une étude anglaise démontre que 32% des végétariens dépassent les doses journalières tolérables recommandées (Wells *et al.* 2017). De plus, certaines zones du globe sont plus sensibles aux contaminations en mycotoxines. Notamment, les fortes températures et hauts taux d'humidité dans les zones tropicales et subtropicales en font des zones idéales pour la croissance fongique et la production de mycotoxines (van Egmond *et al.* 2007). En effet, une étude mondiale à grande échelle démontre que l'Asie de l'Est est la région la plus contaminée en DON. Dans cette région au climat majoritairement subtropical, 84.8% des 13 232 échantillons de céréales prélevés sur une période de 10 ans étaient contaminés par du DON (Gruber-Dorninger *et al.*, 2019).

2. Chez les populations les plus exposées aux génotoxines

L'exposition aux génotoxines, qu'elles proviennent de sources internes (microbiote intestinal) ou externe (génotoxines alimentaires ou thérapeutiques) peut aussi varier selon les populations. Par exemple, on peut suspecter que les patients atteints de Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), qui incluent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, soient plus susceptibles d'être exposés aux *E. coli* producteurs de génotoxines. En effet, chez ces patients, on observe régulièrement des dysbioses du microbiote intestinal (déséquilibres de la flore intestinale). Dans le cas des MICI, ces dysbioses se traduisent souvent par une augmentation des Protéobactéries, embranchement dont fait partie l'espèce *E. coli* (Rizzatti *et al.* 2017). Les gros consommateurs de viande rouge, d'alcool, ou encore de produits transformés, qui peuvent contenir diverses génotoxines alimentaires (**voir partie perspectives D.2.iii**), pourraient également être plus exposés aux génotoxines. De la même manière, certaines populations sont plus fortement exposées aux pesticides. C'est le cas des agriculteurs, étant donné leur environnement de travail. En effet, une étude systémique estime a relevé les cas d'empoisonnements aigus aux pesticides accidentels aux pesticides au niveau mondial, et a estimé que 385 millions d'empoisonnements surviennent chaque année. Parmi ces cas, la population agricole est particulièrement représentée, puisque 44% des agriculteurs sont empoisonnés par des pesticides chaque année (Boedker *et al.*, 2020). D'ailleurs, cette tranche de la population est plus susceptible de développer des myélomes multiples (Presutti *et al.* 2016).

Aux vues des résultats présentés dans cette thèse, il serait pertinent de s'intéresser aux liens épidémiologiques entre un régime alimentaire riche en céréales et le développement de cancers chez ces populations «   risque ». Une étude épidémiologique a déjà évalué le rôle des mycotoxines dans l'induction de cancers grâce à la cohorte EPIC (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*). La cohorte EPIC a été conçue par le CIRC dans le but d'étudier les relations entre le régime alimentaire, l'état nutritionnel, le mode de vie, les facteurs environnementaux, et l'incidence du cancer et d'autres maladies chroniques. Dans cette étude, les auteurs ont confronté les données du questionnaire de l'étude EPIC avec les données d'exposition alimentaire compilées par l'EFSA afin de les relier au risque de cancers colorectaux. De manière intéressante, l'étude suggère que l'exposition au DON était fortement associée au risque de cancer du côlon proximal (Huybrechts *et al.*, 2019).

A la lumière des résultats présentés dans cette thèse, il serait intéressant de reprendre les données analysées dans l'étude de Huybrechts *et al.*, pour les compiler avec les niveaux d'exposition aux gènes toxines chez les participants. La cohorte NutriNet Santé, large étude épidémiologique réalisée sur plus de 100 000 adultes volontaires visant à évaluer les liens entre nutrition et santé, pourrait aussi être un outil pertinent pour appréhender les risques de cancérogénèse liés à l'exposition aux mycotoxines et gènes toxines. Les participants à l'étude NutriNet Santé sont recrutés en continu depuis mai 2009 dans la population générale, et répondent à des questionnaires en ligne sur un site web dédié.

Chez ces personnes « à risque », il pourrait aussi être envisageable d'augmenter la fréquence des dépistages des cancers. La mise en place de ces dépistages « en routine » (dosages sanguins des marqueurs du cancer, coloscopies...) permettrait alors de diagnostiquer la maladie à des stades précoces, pour mieux prévenir son développement. On peut également proposer de mettre en place des dosages réguliers des TCT dans les urines de ces personnes, pour mieux contrôler leur exposition à ces toxines et adapter leur régime alimentaire en conséquence.

3. Cas particulier des personnes sous chimiothérapie

Les 3 molécules testées dans la première étude expérimentale de cette thèse, à savoir le cisplatine, l'étoposide et la phléomycine, sont utilisées, parfois même en cocktail, pour le traitement des cancers. Ces travaux de thèse démontrent que les TCT augmentent l'effet de ces chimiothérapeutiques. Le cas des patients sous chimiothérapie pose des problématiques qui pourraient être, aux vues des nombreux effets toxiques des TCT, considérées comme provoquantes : consommer des produits contaminés en TCT pourrait-il s'avérer bénéfique ? Pourrait-on utiliser les TCT en co-traitement avec des gènes toxines dans le traitement du cancer ? Au contraire, doit-on limiter la consommation de produits céréaliers chez les patients sous chimiothérapie pour éviter d'interférer avec l'activité de leur traitement ? Ces questions sont largement ouvertes à discussion. Cependant, des arguments sont en faveur d'un effet thérapeutique des TCT en cancérologie. En effet, l'homoharringtonine (HHT), seule ribotoxine utilisée en clinique dans le traitement du cancer, présente des effets cytotoxiques synergiques avec plusieurs gènes toxines, et ces synergies ont déjà été exploitées pour traiter certains cancers. De manière intéressante, l'HHT a un mode d'action très similaire aux TCT, puisqu'elle se lie au site A du centre peptidyl transférase du ribosome eucaryote (Garreau de Loubresse *et al.*

2014). L'HHT et sa forme semi-synthétique, l'omacetaxine, sont souvent utilisées en association avec d'autres chimiothérapeutiques, dont des génotoxines. Par exemple, dans le traitement des leucémies myéloïdes aiguës, l'HHT est utilisée en co-traitement avec l'aclarubicine (inhibiteur de topoisomérase responsable de cassures double brin, proche de l'étoposide) et la cytaribine (génotoxine qui s'incorpore dans l'ADN) (Cao *et al.* 2016 ; Jin *et al.*, 2006). *In vitro*, l'HHT présente des effets synergiques avec d'autres inhibiteurs de topoisomérase comme l'amsacrine et l'étoposide (Kantarjian *et al.* 2001 ; Zhang *et al.* 2019), mais aussi avec l'actinomycine D, une génotoxine qui inhibe la synthèse de l'ARNm en interférant avec l'ARN polymérase (Zhou *et al.*, 1995).

Malgré l'efficacité de ces mélanges ribotoxines/génotoxines en chimiothérapie, il faut néanmoins considérer que les effets des TCT ne sont pas ciblés. En effet, les TCT diffusent dans toutes les cellules de l'organisme, car leur action ne nécessite aucun récepteur. La toxine Stx serait probablement plus adaptée à des traitements chimio thérapeutiques, car son action est plus ciblée, et les cellules cancéreuses expriment des hauts niveaux de son récepteur Gb3 (**voir partie expérimentale, chapitre III**).

II. Perspectives

Les perspectives de cette étude se décomposent en deux parties. La première partie propose des pistes pour confirmer et approfondir les mécanismes impliqués dans l'exacerbation de la génotoxicité. La seconde partie propose l'étude de nouvelles interactions entre ribotoxines et génotoxines, pour élargir à nouveau les synergies mises en lumière lors de cette thèse.

A. Confirmation et validation des résultats obtenus lors de cette étude

1. Modèles *ex vivo* et *in vivo*

Les résultats présentés dans ce travail ont été obtenus grâce à des méthodes *in vitro* de culture cellulaire. Pour ne pas restreindre ces observations à des lignées cellulaires intestinales, l'augmentation de la génotoxicité des différentes génotoxines en présence des ribotoxines devra, à l'avenir, être confirmée dans des modèles *ex vivo* et *in vivo*. Le laboratoire ToxAlim au sein duquel cette thèse a été en partie effectuée dispose d'une grande expérience sur les modèles *ex vivo* d'explants intestinaux. Ce modèle présente l'avantage de permettre de réaliser des analyses toxicologiques sur le tissu vivant intestinal en conservant sa polarité et son intégrité extracellulaire (Maresca *et al.*, 2018).

Bien que les études *in vitro* et *ex vivo* présentent de nombreux avantages, elles ne permettent pas de considérer la métabolisation des composés testés, notamment par le microbiote intestinal et le foie. Les modèles *in vivo* permettront de considérer ces paramètres, mais également d'évaluer la toxicité des mélanges génotoxines/ribotoxines sur l'ensemble de l'organisme, en examinant plusieurs organes et paramètres. Les expérimentations seront d'abord menées dans des modèles murins (rats), puis confirmées dans des modèles porcins. En effet, les porcs sont étroitement apparentés aux humains en termes d'anatomie, de génétique, de physiologie et de régime alimentaire. D'ailleurs, plus de 80% des paramètres immunitaires du porc sont similaires à ceux de l'Homme (Dawson *et al.* 2013). Ainsi, les expériences menées sur les porcs sont susceptibles de mieux prédire les effets physiopathologiques chez l'Homme. Les porcs présentent également une plus grande sensibilité aux mycotoxines par rapport aux rongeurs (Pinton and Oswald 2014).

2. Lignes directrices de l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE)

Cette étude souligne l'importance de considérer les effets « cocktail ». En Europe, l'EFSA a pour objectif d'évaluer les risques liés à l'exposition aux toxiques pour fournir des recommandations Européennes, en sélectionnant les études les plus pertinentes. L'EFSA privilégie les études intégrant des essais respectant les lignes directrices de l'Organisation de Coopération et de Développement Économique (OCDE). Pour permettre la prise en compte de ces travaux de thèse dans l'évaluation du risque, les résultats devraient donc être appuyés par ce type d'essais, incluant, par exemple, le test des comètes, ou le test des micronoyaux. Ces tests, qui ne passent pas par l'utilisation d'un marqueur de dommages à l'ADN, révèlent directement la présence de dommages à l'ADN. En revanche, il est à noter que le test des comètes ne pourra pas être applicable aux mélanges comprenant des agents alkylant l'ADN comme le cisplatine. En effet, la présence de pontages inter brins dans l'ADN inhibe la formation de la queue de comète (Muruzabal *et al.* 2021).

B. Hypothèses expliquant l'exacerbation de la génotoxicité induite par les ribotoxines

Les études présentées dans cette thèse ont montré que l'inhibition du ribosome est responsable de l'exacerbation de la génotoxicité. Or, les mécanismes précis n'ont pas été élucidés. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour élucider les mécanismes cellulaires responsables de ce nouvel effet des ribotoxines.

1. Inhibition de la réponse aux dommages à l'ADN

L'hypothèse privilégiée porte sur l'inhibition de la DDR. En effet, en inhibant la traduction protéique, les ribotoxines pourraient perturber directement la synthèse de protéines de réparation de l'ADN, empêchant ainsi la cellule de prendre en charge efficacement les dommages induits par les génotoxines. Dans des expérimentations à venir, il serait donc intéressant de mesurer l'expression de différents acteurs de la réponse aux dommages à l'ADN (ATM, ATR, p53, Chk1, Chk2...), notamment par western blot.

La kinase activée par l'ARN, également connue sous le nom de protéine kinase R (PKR), est l'une des premières candidates au cœur des investigations. PKR a d'abord été identifiée comme un protecteur cellulaire contre les infections virales. C'est un régulateur majeur de processus cellulaires centraux, notamment la traduction de l'ARNm, le contrôle de la transcription, la régulation de l'apoptose et la prolifération cellulaire. PKR joue notamment un rôle dans la DDR, puisqu'elle régule à la baisse la réparation des dommages à l'ADN. L'induction de PKR a d'ailleurs une fonction oncogène qui favorise l'accumulation de mutations potentiellement délétères, et l'inhibition de PKR a été proposée comme stratégie de lutte contre le cancer (Cheng *et al.* 2015). De plus, les protéines de la voie de l'anémie de Fanconi, impliquées dans la prise en charge des pontages à l'ADN interagissent avec la kinase PKR, et l'activation de PKR sensibilise les cellules à plusieurs agents génotoxiques, tels que la mitomycine C ou la doxorubicine (Zhang *et al.* 2004 ; Bennett *et al.* 2012). De manière intéressante, il a été montré que le DON est un activateur de PKR (Zhou *et al.* 2014). En activant PKR, le DON pourrait sensibiliser les cellules aux génotoxines en réduisant le taux de réparation des dommages à l'ADN. Cette hypothèse est en cours d'investigation au laboratoire, notamment en utilisant des inducteurs (transfection de Poly :IC) ou des inhibiteurs (C16 PKRi) de PKR chez des cellules co-traitées avec les mélanges de génotoxines et ribotoxines.

2. Réponse au stress ribotoxique

La réponse au stress ribotoxique (RSR), qui implique l'activation des MAP kinases et d'autres kinases en amont, comme la kinase ZAK α , est l'une des conséquences majeures de l'inhibition ribosomale (Vind *et al.*, 2020). La RSR est d'un intérêt particulier pour mieux comprendre les mécanismes responsables de l'exacerbation de la génotoxicité. En effet, les MAPK sont impliquées dans de nombreuses réponses cellulaires, car elles ont de multiples cibles.

En particulier, les MAPK activent la réponse inflammatoire, qui pourrait sensibiliser les cellules aux génotoxines (**voir partie B.iii**). Pour incriminer la RSR dans ce nouvel effet des ribotoxines, il serait envisageable d'utiliser des inhibiteurs des différentes familles de MAPK. Une autre molécule intéressante à tester dans le cadre de cette hypothèse est la pactamycine. En effet, la pactamycine est une ribotoxine qui n'induit que très faiblement la RSR (Iordanov *et al.* 1997).

L'hypothèse d'un rôle éventuel de la RSR dans l'exacerbation de la génotoxicité pourrait également être testée en amont de la cascade de la RSR, au niveau de la kinase ZAK α . Cette kinase, senseur de collisions entre ribosomes très en amont de la RSR, active les voies des MAPK (Vind *et al.* 2020). Pour tester l'implication de ZAK α , on peut proposer de tester l'inhibiteur spécifique de cette kinase (PLX 4720), en co-traitement ou pré-traitement avec les cocktails de ribotoxines et génotoxines. D'ailleurs, des expérimentations préliminaires menées en collaboration avec l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS) de Toulouse ont mis en évidence le rôle de ZAK α dans la toxicité de Stx. En effet, ces essais ont démontré que l'inhibition de ZAK α par PLX 4720 protège les cellules HUVEC de la mort cellulaire et empêche l'activation de l'inflammasome NLRP1 par Stx. Les effets partagés entre Stx et les TCT laissent penser que cette kinase pourrait également être impliquée dans la toxicité des TCT. Une éventuelle perte de l'exacerbation de la génotoxicité en présence d'un inhibiteur de ZAK α mettrait en évidence des événements précoces de la RSR (détection des dommages ribosomaux) dans ce nouvel effet des ribotoxines.

3. **Inflammation**

Comme décrit dans la revue introductive, les ribotoxines sont à l'origine de phénomènes inflammatoires provoqués par l'activation des MAPK (Saenz *et al.*, 2010 ; Pestka, 2010). De nombreux phénomènes inflammatoires sont décrits comme influençant directement les processus de réparation des dommages à l'ADN. Par exemple, la O-6-méthylguanine-méthyltransférase (MGMT), ou encore les protéines de la famille des hétérodimères Ku, sont susceptibles d'être régulées à la baisse en conditions pro-inflammatoires (Mikhed *et al.* 2015). Une autre étude démontre que dans des conditions de stress caractéristiques de l'inflammation, les lésions à l'ADN de type oxydatives sont susceptibles d'être prises en charge moins efficacement par les cellules (Moritz *et al.* 2014).

De plus, le facteur de transcription NFκB, acteur de la réponse inflammatoire activé en réponse au DON et à Stx, régule à la baisse l'activité du suppresseur de tumeur p53, qui joue un rôle majeur dans la réparation des dommages à l'ADN (Hudson *et al.* 1999 ; Gudkov *et al.* 2011). Les réponses inflammatoires déclenchées en réponse aux cocktails de génotoxines et ribotoxines pourront, à l'avenir, être mesurés par qPCR, western blot et dosages ELISA *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Des lignées cellulaires KO pour l'inflammasome NLRP1, disponibles à l'IPBS, pourront également être utilisées.

Il est important de noter que l'inflammation est indissociable du stress oxydatif, qui désigne un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (radicaux libres) et la quantité d'antioxydants disponibles. En effet, les phénomènes inflammatoires et pro-oxydants sont étroitement liés les uns aux autres, et sont susceptibles de se potentialiser mutuellement. D'une part, les cellules inflammatoires libèrent un grand nombre d'espèces réactives de l'oxygène, favorisant ainsi le stress oxydatif (Federico *et al.* 2007). Réciproquement, les espèces réactives de l'oxygène initient de nombreuses cascades de réactions qui peuvent mener à l'augmentation de l'expression de gènes pro-inflammatoires (Anderson and Herzenberg 1994). De ce fait, le stress oxydatif induit par les ribotoxines doit être envisagé comme impliqué dans l'exacerbation de la génotoxicité, en parallèle de l'inflammation.

4. Stress oxydatif

Les ribotoxines sont des composés fortement pro-oxydants (Mishra *et al.*, 2014 ; Gomez *et al.*, 2013). Notamment, le DON, mais aussi d'autres ribotoxines, augmente le contenu en espèces réactives de l'oxygène dans divers tissus de l'organisme, *in vitro* comme *in vivo*, en diminuant les contenus en antioxydants (gluthathion, catalase, superoxide dismutase...) (pour une revue, voir Mishra *et al.*, 2014). De manière intéressante, le stress oxydant a déjà été impliqué dans l'exacerbation de l'effet d'une génotoxine par une ribotoxine. En effet, l'étude de Zhang *et al.* démontre que l'HHT et l'étoposide présentent une cytotoxicité synergique, qui est liée à la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène induite par l'HHT (Zhang *et al.*, 2019). Cette étude montre que l'HHT réduit l'expression d'une enzyme antioxydante, la thioredoxine. Les auteurs suggèrent un rôle de la protéine DJ-1 dans cette synergie. En effet, l'HHT pourrait réguler à la baisse cette protéine, entraînant une réduction de l'expression du *nuclear factor erythroid-2-related factor* (NRF2).

NRF2 est un facteur de transcription sensible au potentiel redox qui active plusieurs gènes de défense antioxydantes, notamment celui de la thiorédoxine (Zhang *et al.*, 2019). Une étude a d'ailleurs montré que le DON inhibe l'activité du facteur NRF2, supprimant ainsi la protection antioxydante des cellules (Ndlovu *et al.* 2021).

Pour incriminer le stress oxydatif dans l'exacerbation de la génotoxicité, plusieurs stratégies sont ou seront mises en place au laboratoire. D'abord, le stress oxydant sera mesuré à l'aide de kits de dosage des espèces réactives de l'oxygène. Des expérimentations préliminaires utilisant des cellules coliques de souris sauvages KO pour le facteur de transcription NRF2 sont également en cours. De plus, plusieurs antioxydants naturels (curcumin, vitamine C...) ou chimiques (N-acétyl cystéine (NAC)...) seront testés, en pré-traitement ou co-incubation avec les mélanges de génotoxines et ribotoxines. Une diminution du phénotype d'exacerbation de la génotoxicité dans les cellules KO pour NRF2 ou traitées par les antioxydants permettrait alors d'incriminer le stress oxydant dans ce nouvel effet des ribotoxines. De plus, l'Institut de Recherche en Santé Digestive, au sein duquel cette thèse s'est en partie déroulée, s'est récemment équipé d'une station à hypoxie, qui permet de régler de manière précise les niveaux d'oxygène auxquels les cultures cellulaires sont exposées. Grâce à cette station, on peut imaginer jouer sur les niveaux d'oxygénation des cellules pendant ou avant l'exposition aux mélanges, pour modifier le potentiel redox intracellulaire et faire varier les niveaux de stress oxydatif.

5. Dysfonction mitochondriale

Les ribotoxines, et notamment le DON et Stx, perturbent la fonction mitochondriale (Bin-Umer *et al.*, 2011 ; Platnich *et al.*, 2018). Cette conséquence de l'intoxication aux ribotoxines pourrait être impliquée dans l'exacerbation de la génotoxicité. En effet, la dysfonction mitochondriale entraîne une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène, déséquilibrant la balance espèces réactives de l'oxygène/anti oxydants (Murphy 2009). De plus, la dysfonction mitochondriale entraîne une diminution de la synthèse d'ATP, nécessaire au fonctionnement de plusieurs protéines de la DDR. Pour élucider les mécanismes impliqués dans l'exacerbation de la génotoxicité, il serait donc envisageable d'analyser le stress mitochondrial déclenché en réponse aux mélanges ribotoxines/génotoxines (notamment à l'aide du système SeaHorse). On peut aussi envisager de tester la capacité d'inhibiteurs de la fonction mitochondriale (antimycine A, oligomycine) à reproduire l'effet d'exacerbation de la génotoxicité.

Pour conclure ce chapitre, il est important de garder à l'esprit que les causes de l'exacerbation de la génotoxicité sont probablement multifactorielles. En effet, tous les mécanismes cellulaires décrits dans ce chapitre sont susceptibles de s'entrecroiser et/ou de coexister. D'ailleurs, l'étude de Zhang *et al.* souligne ce point, en montrant qu'un anti-oxydant ne réduit que partiellement la synergie entre l'HHT et l'étoposide (Zhang *et al.*, 2019).

C. Etude des conséquences de l'exacerbation de la génotoxicité

Pour aller plus loin, et confirmer que les dommages à l'ADN accumulés en présence des cocktails de ribotoxines et génotoxines peuvent être à l'origine de phénotypes malins, des expérimentations sur des modèles *in vitro*, mais aussi *in vivo* sont à prévoir. *In vitro*, les effets de ces cocktails sur l'instabilité génétique (test des micronoyaux, croissance en *soft agar*, aberrations chromosomiques...) seront déterminés. *In vivo*, nous utiliserons le modèle rat, qui prend en compte l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'excrétion des xénobiotiques et est considéré comme pertinent pour l'exposition humaine. Dans les tissus intestinaux des rats co-exposés aux ribotoxines et génotoxines, les cassures double-brin de l'ADN (foyers γ H2AX et 53BP1), les modifications chromosomiques structurelles (ponts d'anaphase, aberrations chromosomiques) et les lésions pré néoplasiques coliques seront évaluées.

D. Élargissement à d'autres composés

Les résultats présentés dans cette thèse suggèrent que d'autres génotoxines et ribotoxines de l'exposome pourraient interagir entre elles. De plus, cette thèse s'est focalisée sur l'étude de mélanges à deux composantes. Considérant le fait que l'Homme est exposé à bien plus que deux toxiques, il serait intéressant d'évaluer l'effet de ces toxines en mélanges binaires, ternaires, voir même encore plus complexes.

1. Autres ribotoxines

Plusieurs inhibiteurs des ribosomes eucaryotes font partie de l'exposome, et seraient donc susceptibles d'augmenter les dommages à l'ADN causés par des génotoxines. Par exemple, certains antibiotiques à spectre large, appartenant notamment à la famille des aminoglycosides, ciblent non seulement les ribosomes procaryotes, mais aussi les ribosomes eucaryotes (Prokhorova *et al.* 2017). Aux vues de leur large utilisation en médecine humaine, il serait intéressant de connaître l'impact de ces antibiotiques sur la génotoxicité.

D'autres ribotoxines bactériennes auxquelles nous sommes susceptibles d'être exposés, comme l'exotoxine A, produite par *Pseudomonas aeruginosa* durant l'infection (Michalska and Wolf 2015), pourront également être testées. Il serait évidemment envisageable de faire un *screening* de toute la famille des TCT, mais pour aller plus loin dans cette étude, l'étude des TCT en mélange serait plus pertinente. En effet, comme décrit dans l'introduction de cette thèse, les mycotoxines se retrouvent très fréquemment en co-occurrence dans l'alimentation, et on peut s'attendre, selon les doses, à des effets synergiques des mélanges de TCT. On peut également imaginer tester des mélanges à multiples composantes incluant la ribotoxine bactérienne Stx en interaction avec un ou plusieurs TCT, et une ou plusieurs génotoxines. Ces approches, plus compliquées à mettre en place et à analyser, permettraient cependant de mieux appréhender la complexité de la notion d'« exposome ».

2. Autres génotoxines

i. *Agents chimiques et chimiothérapie*

L'introduction de cette thèse a décrit 3 molécules couramment utilisées dans les traitements chimiothérapeutiques : le cisplatine, l'étoposide et les bléomycines. De manière intéressante, ces molécules sont souvent utilisées en mélange. En chimiothérapie, et notamment dans le traitement du cancer du côlon, d'autres génotoxines peuvent être administrées aux patients, seules ou en mélanges. Parmi ces drogues, on peut retrouver le 5-Fluorouracil (5-FU), l'irinotecan (Camptosar), l'oxaliplatine (Eloxatine), ou la trifluridine/tipiracil (Lonsurf) (Goyle and Maraveyas, 2005). Pour approfondir les hypothèses concernant l'impact des ribotoxines (TCT comme Stx) chez les patients sous chimiothérapie, il serait intéressant de tester l'interaction entre ces molécules thérapeutiques, seules ou en mélanges, et des ribotoxines.

ii. *Génotoxines bactériennes*

Dans cette étude, deux génotoxines bactériennes, la colibactine et la toxine CDT, ont été étudiées. Il existe de nombreuses génotoxines bactériennes auxquelles l'Homme est susceptible d'être exposé. On peut par exemple citer la toxine typhoïde, analogue de CDT produite par *Salmonella Typhi* (Ibler *et al.* 2019). De plus, de nouvelles génotoxines bactériennes ont été découvertes très récemment, en exposant de l'ADN à des bactéries du microbiote intestinal de patients atteints de MICI (Cao *et al.* 2022). Les auteurs ont découvert une famille de métabolites microbiens induisant des dommages à l'ADN, appelés indolimines, produits par la bactérie *Morganella morganii*.

De manière intéressante, ces métabolites pourraient être impliqués dans la carcinogénèse intestinale. En effet, les auteurs ont démontré que les bactéries productrices d'indolimines favorisent le développement de tumeurs dans un modèle murin, contrairement aux bactéries incapables de les produire (Cao *et al.*, 2022). A l'avenir, il serait intéressant d'évaluer l'impact de l'exposition aux ribotoxines sur la carcinogénèse induite par ces nouvelles génotoxines bactériennes du microbiote intestinal.

iii. Génotoxines alimentaires

Au-delà des pesticides cités en introduction, de nombreuses génotoxines contaminent notre alimentation, et pourraient donc voir leur génotoxicité augmentée en présence de ribotoxines. De cette hypothèse, découle un nouveau projet de recherche inter-équipes impliquant l'équipe Biosynthèse et Toxicité des Mycotoxines et l'équipe Prévention et Promotion de la Cancérogénèse par les Aliments de ToxAlim. Dans ce nouveau projet, trois génotoxines alimentaires, très prévalentes dans l'alimentation, seront étudiées : le fer héminique, l'acétaldéhyde, et l'acrylamide. L'effet du DON sur la génotoxicité et la mutagénicité de ces composés sera évalué *in vitro* comme *in vivo*. Ce projet a donné lieu à l'obtention d'un financement par l'institut Olga Triballat.

Fer héminique

Des études épidémiologiques ont démontré une forte association entre consommation de viande rouge et cancer colorectal. Notamment, les travaux de Pierre et collaborateurs ont montré qu'un régime riche en viande rouge augmente le nombre de lésions précancéreuses dans le côlon de rats (Bastide *et al.* 2015). Cette association peut s'expliquer par la présence de fer héminique dans ces produits. Le fer héminique, ou hémine, est une forme de fer associé à l'hémoglobine, composé majeur du sang. Il catalyse la formation de produits de peroxydation lipidique et de composés N-nitrosés hautement réactifs, qui forment notamment des mono-adduits et des cassures de l'ADN (Guéraud 2017) (**figure 22**).

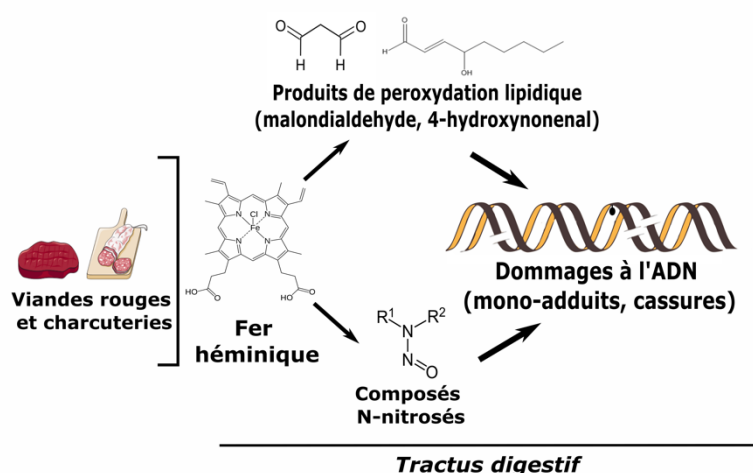


Figure 22 : Génotoxicité du fer héminique. Le fer héminique catalyse la formation de produits de peroxydation lipidique (malondialdehyde, MDA), 4 hydroxynonenal (4-HNE), et de composés N-nitrosés, qui induisent des dommages à l'ADN de type mono-adduits ou cassure simple et double brin.

Acétaldéhyde

L'alcool est la deuxième cause évitable de mortalité par cancers. En 2015, on estime à 41 000 le nombre de décès attribuables à l'alcool. Parmi les causes de décès associées à l'alcool, les cancers occupent la première place avec 16 000 morts par an, et consommer plus de 6 verres d'alcool par jour augmente de 50 fois le risque de développer un cancer (Poschl 2004). La cancérogénèse liée à l'alcool est notamment due à sa métabolisation en acétaldéhyde, composé 30 fois plus toxique que l'éthanol, classé cancérogène avéré par le CIRC. Après ingestion, l'alcool est absorbé par le tractus intestinal puis transporté au niveau hépatique, où il est métabolisé en acétaldéhyde par l'alcool déshydrogénase (ADH). Cette métabolisation peut aussi être effectuée au niveau du côlon ou de la cavité buccale par certaines bactéries du microbiote. L'acétaldéhyde provoque diverses formes de dommages à l'ADN, notamment des pontages à l'ADN et des cassures simple et/ou double brin (Seitz and Stickel 2010) (**figure 23**).

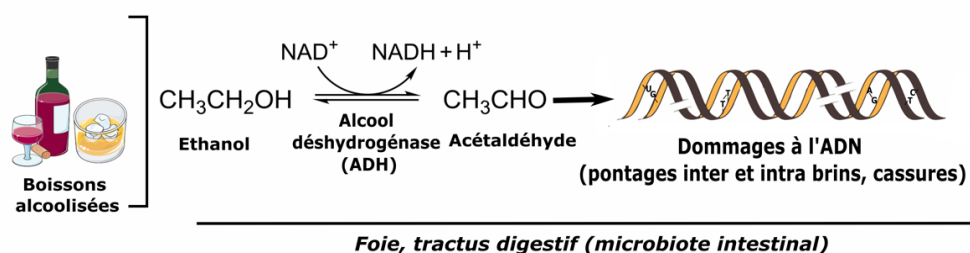


Figure 23 : Génotoxicité de l'acétaldéhyde. L'éthanol est métabolisé en acétaldéhyde par l'alcool déshydrogénase (ADH). L'acétaldéhyde induit des dommages à l'ADN de type pontages inter et intra brins et des cassures de l'ADN, simple et double brin.

Acrylamide

L'acrylamide est une molécule utilisée notamment pour produire son polymère, le polyacrylamide, utilisé notamment comme coagulant dans le traitement des eaux usées ou dans les gels d'électrophorèse. L'acrylamide a été classé dans le groupe 2A (potentiellement cancérigène pour l'Homme) par le CIRC en 2014. L'Homme est exposé à l'acrylamide majoritairement par voie alimentaire. En effet, l'acrylamide se forme lors de la cuisson et torréfaction de certains aliments (réaction de Millard). Notamment, les chips, le café et les biscuits contiennent de fortes teneurs en acrylamide. Après absorption au niveau intestinal, l'acrylamide est métabolisé par les cytochromes P450 au niveau hépatique en glycidamide. L'acrylamide en lui-même est peu génotoxique, sa mutagénicité est plutôt associée au glycidamide, qui forme des adduits à l'ADN qui dégénèrent en cassures de l'ADN (EFSA 2022) (figure 24).

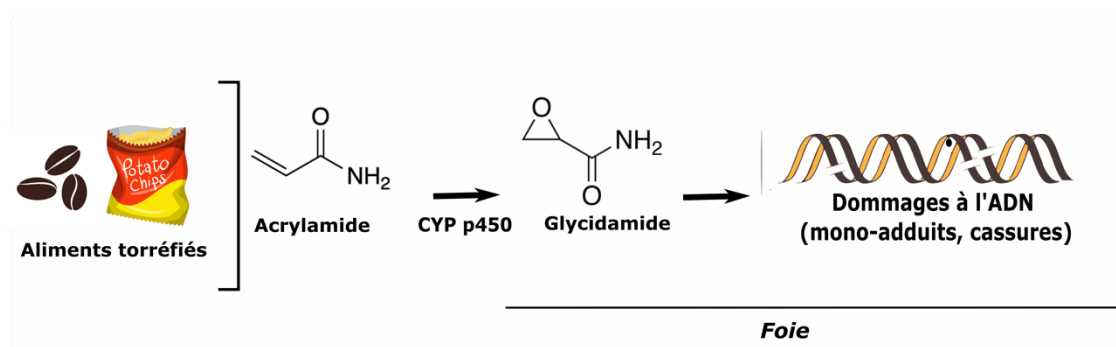


Figure 24 : Génotoxicité de l'acrylamide. L'acrylamide est métabolisé en glycidamide par les cytochromes P450. Le glycidamide induit des dommages à l'ADN de type adduits à l'ADN.

E. Projets de recherche en cours

Cette étude s'est inscrite dans un projet de recherche plus large, qui vise à mieux comprendre l'interaction entre colibactine et DON, notamment au travers d'expérimentations *in vivo* (analyses du microbiote de souris co-exposées au DON et à la colibactine, analyses histologiques visant à déterminer l'impact des TCT sur la niche écologique d'*E. coli* dans l'intestin...). Ce travail de thèse a également initié un nouveau projet de recherche coordonné par l'équipe Génotoxicité et Signalisation de ToxAlim. Ce projet a pour but de tester l'impact du DON sur la génotoxicité de multiples contaminants (métaux lourds, polluants organiques persistants, pesticides, additifs et composés néoformés), et d'élucider les modes d'actions impliqués dans cette synergie. Enfin, cette étude a donné lieu à un nouveau projet de thèse qui vise à étudier spécifiquement les interactions entre l'aflatoxine, mycotoxine génotoxique et cancérigène hépatique, et le DON.

CONCLUSION

Pour conclure, cette thèse a permis une meilleure compréhension d'un nouvel effet du DON découvert en 2017. L'objectif général était d'apporter de nouvelles données sur les mécanismes impliqués dans l'exacerbation de la génotoxicité. Ces travaux de thèse ont permis de mettre en lumière que ce nouvel effet n'est pas spécifique du DON ni de la colibactine, mais applicable à une variété de génotoxines et ribotoxines. Les résultats obtenus dans ce travail ont permis d'améliorer les connaissances sur les interactions entre toxines de l'exposome, en mettant en lumière l'existence de multiples synergies.

Ce projet de thèse a également ouvert à de nouvelles problématiques, et permis d'amorcer de nouveaux projets de recherche. Notamment, les résultats de ce travail seront élargis à diverses génotoxines alimentaires, ou à des fins plus thérapeutiques (interaction entre la Shiga toxine et traitements chimio thérapeutiques). En perspectives, la confirmation des résultats de ce travail, notamment *in vivo*, nous apportera les informations nécessaires à la prise en compte des effets « cocktail » dans l'évaluation du risque. De manière globale, ce travail a souligné que l'étude des toxines prises séparément pourrait mener à une sous-estimation du risque toxicologique.

REFERENCES

Références

Alhmoud JF, Woolley JF, Al Moustafa AE *et al.* 2020. DNA Damage/Repair Management in Cancers. *Cancers (Basel)*. 12 :1050. doi : 10.3390/cancers12041050.

Allué-Guardia A, Martínez-Castillo A, Muniesa M. 2014. Persistence of infectious Shiga toxin-encoding bacteriophages after disinfection treatments. *Appl Environ Microbiol.* 80 :2142-9. doi : 10.1128/AEM.04006-13.

Anderson MT, Herzenberg LA. 1994. Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF- κ B signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 91 :11527-31. doi : 10.1073/pnas.91.24.11527.

Ansari KI, Hussain I, Das HK, Mandal SS. 2009. Overexpression of human histone methylase MLL1 upon exposure to a food contaminant mycotoxin, deoxynivalenol. *FEBS Journal* 276 :3299–3307. doi : 10.1111/j.1742-4658.2009.07055.x.

Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, *et al.* 2012. Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota. *Science* 338 :120–123. doi : 10.1126/science.1224820.

Baldo V, Salogni C, Giovannini S, *et al.* 2020. Pathogenicity of Shiga Toxin Type 2e *Escherichia coli* in Pig Colibacillosis. *Front Vet Sci.* 7 :545818. doi : 10.3389/fvets.2020.545818.

Baranzoni GM, Fratamico PM, Gangiredla J *et al.* 2016. Characterization of Shiga Toxin Subtypes and Virulence Genes in Porcine Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 7 :574. doi : 10.3389/fmicb.2016.00574.

Barouki R. 2020. L'exposome, un concept holistique et utile. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 204 :299–305. doi : 1016/j.banm.2019.11.015.

Bastide NM, Chenni F, Audebert M, *et al.* 2015. A Central Role for Heme Iron in Colon Carcinogenesis Associated with Red Meat Intake. *Cancer Research* 75 :870–879. doi : 10.1158/0008-5472.CAN-14-2554.

Bennett RL, Carruthers AL, Hui T, *et al.* 2012. Increased Expression of the dsRNA-Activated Protein Kinase PKR in Breast Cancer Promotes Sensitivity to Doxorubicin. *PLoS One* 7 :e46040. doi : 10.1371/journal.pone.0046040

Bezine E, Vignard J, Mirey G. 2014. The cytolethal distending toxin effects on Mammalian cells : a DNA damage perspective. *Cells.* 3 :592-615. doi : 10.3390/cells3020592.

Bielaszewska M, Sinha B, Kuczius T, Karch H. 2005. Cytolethal distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells. *Infect Immun.* 73 :552-62. doi : 10.1128/IAI.73.1.552-562.2005.

Bielaszewska M, Friedrich AW, Aldick T, *et al.* 2010 Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans : predictor for a severe clinical outcome. *Clin Infect Dis.* 43 :1160-7. doi : 10.1086/508195.

Bielaszewska M, Rüter C, Bauwens A, *et al.* 2017. 'Host cell interactions of outer membrane vesicle-associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : Intracellular delivery, trafficking and mechanisms of cell injury. *PLoS Pathog.* 13 :e1006159. doi : 10.1371/journal.ppat.1006159.

Bin-Umer MA, McLaughlin JE, Basu D *et al.* 2011. Trichothecene mycotoxins inhibit mitochondrial translation--implication for the mechanism of toxicity. *Toxins (Basel).* 3 :1484-501. doi : 10.3390/toxins3121484.

Blanco M, Blanco JE, Mora A, *et al.* 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-xi). *J. of clin. microbiol.* 2 : 645-51. doi : 10.1128/JCM.42.2.645-651.2004.

Blazkova H, Krejčíková K, Moudry P, *et al.* 2010. Bacterial intoxication evokes cellular senescence with persistent DNA damage and cytokine signalling. *J. Cell. Mol. Med.* 14 :357–367. doi : 10.1111/j.1582-4934.2009.00862.x.

Boedeker W, Watts M, Clausing P. *et al.* 2020. The global distribution of acute unintentional pesticide poisoning : estimations based on a systematic review. *BMC Public Health.* 20 : 1875. doi : 10.1186/s12889-020-09939-0.

Bomberger JM, Maceachran DP, Coutermarsh BA, *et al.* 2009. Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. *PLoS Pathog.* 5 :e1000382. doi : 10.1371/journal.ppat.1000382.

Bony S, Carcelen M, Olivier L, Devaux A. 2006. Genotoxicity assessment of deoxynivalenol in the Caco-2 cell line model using the Comet assay. *Toxicology Letters* 166 :67–76. doi : 10.1016/j.toxlet.2006.04.010.

Bossuet-Greif N, Belloy M, Boury M, *et al.* 2017. Protocol for HeLa Cells Infection with *Escherichia coli* Strains Producing Colibactin and Quantification of the Induced DNA-damage. *Bio Protoc.* 7 :e2520. doi : 10.21769/BioProtoc.2520.

Bossuet-Greif N, Vignard J, Taieb F, *et al.* 2018. The Colibactin Genotoxin Generates DNA Interstrand Cross-Links in Infected Cells. *mBio* 9 : e02393-17. doi : 10.1128/mBio.02393-17.

Brett KN, Ramachandran V, Hornitzky MA, *et al.* 2003. stx1c Is the most common Shiga toxin 1 subtype among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from sheep but not among isolates from cattle. *J Clin Microbiol.* 3 :926-36. doi : 10.1128/JCM.41.3.926-936.2003.

Buc E, Dubois D, Sauvanet P, *et al.* 2013. High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. *PLoS One.* 8 :e56964. doi : 10.1371/journal.pone.0056964.

Bürk C, Dietrich R, Açar G, Moravek M, *et al.* 2003. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT :H19 of bovine origin. *J Clin Microbiol.* 41 :2106–2112. doi : 10.1128/JCM.41.5.2106-2112.2003.

Cao J, Feng H, Ding N, *et al.* 2016. Homoharringtonine combined with aclarubicin and cytarabine synergistically induces apoptosis in t(8 ;21) leukemia cells and triggers caspase-3-mediated cleavage of the AML1-ETO oncoprotein. *Cancer Med.* 5 :3205–3213. doi : 10.1002/cam4.913.

Cao Y, Oh J, Xue M, *et al.* 2022. Commensal microbiota from patients with inflammatory bowel disease produce genotoxic metabolites. *Science.* 378 :eabm3233. doi : 10.1126/science.abm3233.

Carette JE, Guimaraes CP, Wuethrich I, *et al.* 2011. Global gene disruption in human cells to assign genes to phenotypes by deep sequencing. *Nat Biotechnol.* 29 :542–546. doi : 10.1038/nbt.1857.

Cedergreen N. 2014. Quantifying Synergy : A Systematic Review of Mixture Toxicity Studies within Environmental Toxicology. *PLoS ONE* 9 :e96580. doi : 10.1371/journal.pone.0096580.

Chagneau CV, Payros D, Tang-Fichaux M, *et al.* 2022. The pks island : a bacterial Swiss army knife? Colibactin : beyond DNA damage and cancer. *Trends in Microbiology.* 30 :1146–1159. doi : 10.1016/j.tim.2022.05.010.

Chan PF, Srikannathasan V, Huang J, *et al.* 2015. Structural basis of DNA gyrase inhibition by antibacterial QPT-1, anticancer drug etoposide and moxifloxacin. *Nat Commun.* 6 :10048. doi : 10.1038/ncomms10048.

Chen J, Stubbe J. 2005. Bleomycins : towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 5 :102–112. doi : 10.1038/nrc1547.

Cheng X, Byrne M, Brown KD, *et al.* 2015. PKR inhibits the DNA damage response, and is associated with poor survival in AML and accelerated leukemia in NHD13 mice. *Blood.* 126 :1585–1594. doi : 10.1182/blood-2015-03-635227.

Crawford J, Dale DC, Lyman GH. 2004. Chemotherapy-induced neutropenia : risks, consequences, and new directions for its management. *Cancer.* 100 :228-37. doi : 10.1002/cncr.11882.

Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, *et al.* 2010. *Escherichia coli* induces DNA damage *in vivo* and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 107 :11537–11542. doi : 10.1073/pnas.1001261107.

Dasari S, Tchounwou P. 2014. Cisplatin in cancer therapy : Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* 740 :364–378. doi : 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.

Dawson HD, Loveland JE, Pascal G, *et al.* 2013. Structural and functional annotation of the porcine immunome. *BMC Genomics.* 14 :332. doi : 10.1186/1471-2164-14-332.

Dejea CM, Fathi P, Craig JM, *et al.* 2018. Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science*. 359 :592–597. doi : 10.1126/science.aah3648.

Dennis KK, Auerbach SS, Balshaw DM, *et al.* 2016. The Importance of the Biological Impact of Exposure to the Concept of the Exposome. *Environmental Health Perspectives* 124 :1504–1510. doi : 10.1289/EHP140.

DiRienzo JM. 2014. Uptake and processing of the cytolethal distending toxin by mammalian cells. *Toxins (Basel)*. 11 :3098–3116. doi : 10.3390/toxins6113098.

Dmitriev SE, Vladimirov DO, Lashkevich KA. 2020. A Quick Guide to Small-Molecule Inhibitors of Eukaryotic Protein Synthesis. *Biochemistry Moscow*. 85 :1389–1421. doi : 10.1134/S0006297920110097.

Doohan FM, Brennan J, Cooke BM. 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi* 109 : 755–768. doi : 10.1023/A :1026090626994.

Dziubańska-Kusibab PJ, Berger H, Battistini F. *et al.* 2020. Colibactin DNA-damage signature indicates mutational impact in colorectal cancer. *Nat Med*. 20 :1063–1069. doi : 10.1038/s41591-020-0908-2.

Eddleston M, Karalliedde L, Buckley N, *et al.* 2002. Pesticide poisoning in the developing world—a minimum pesticides list. *The Lancet*. 360 :1163–1167. doi : 10.1016/s0140-6736(02)11204-9.

EFSA Scientific Committee. 2016. Use of the benchmark dose approach in risk assessment EFSA Scientific Committee *EFSA Journal*. 15 :1. doi : 10.2903/j.efsa.2017.4658.

EFSA Scientific Committee. 2017a. Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA Journal*. 15 :4718. doi :10.2903/j.efsa.2017.4718

EFSA Scientific Committee. 2017b. Appropriateness to set a group health based guidance value for nivalenol and its modified forms. *EFSA Journal*. 15 :4. doi : 10.2903/j.efsa.2017.4751.

EFSA Scientific Committee. 2017c. Human and animal dietary exposure to T-2 and HT-2 toxin. *EFSA Journal*. 15 :4972. doi : 10.2903/j.efsa.2017.4972.

EFSA Scientific Committee. 2018. Risk to human and animal health related to the presence of 4,15-diacetoxyscirpenol in food and feed. *EFSA Journal*. 16 :5357. doi : 10.2903/j.efsa.2018.5367

EFSA Scientific Committee. 2019. Guidance on harmonised methodologies for human health, animal health and ecological risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. *EFSA Journal* 17 :5634 doi : 10.2903/j.efsa.2019.5634

EFSA Scientific Committee. 2022. Assessment of the genotoxicity of acrylamide. *EFSA Journal*. 20 :5. doi : 10.2903/j.efsa.2022.7293.

Engedal N, Skotland T, Torgersen ML, Sandvig K. 2011. Shiga toxin and its use in targeted cancer therapy and imaging. *Microb Biotechnol*. 4 :32-46. doi : 10.1111/j.1751-7915.2010.00180.x.

Elder JR, Fratamico PM, Liu Y, *et al*. 2021. A Targeted Sequencing Assay for Serotyping *Escherichia coli* Using AgriSeq Technology. *Frontiers in microbiology*. 11 :627997. doi : 10.3389/fmicb.2020.627997.

Escher BI, Hackermüller J, Polte T, *et al*. 2017. From the exposome to mechanistic understanding of chemical-induced adverse effects. *Environment International*. 99 :97–106. doi : 10.1016/j.envint.2016.11.029.

Eshraghi A, Maldonado-Arocho FJ, Gargi A, *et al*. 2010. Cytolethal Distending Toxin Family Members Are Differentially Affected by Alterations in Host Glycans and Membrane Cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*. 285 :18199–18207. doi : 10.1074/jbc.M110.112912.

Eskola M, Kos G, Elliott CT, *et al*. 2020. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins : Validity of the widely cited ‘FAO estimate’ of 25. *Crit Rev Food Sci*. 60 :2773-2789. doi : 10.1080/10408398.2019.1658570.

Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, *et al*. 2007. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer*. 121 :2381–2386. doi : 10.1002/ijc.23192

Fedor Y, Vignard J, Nicolau-Travers M-L, *et al*. 2013. From single-strand breaks to double-strand breaks during S-phase : a new mode of action of the *Escherichia coli* Cytolethal Distending Toxin. *Cellular Microbiology*. 15 :1–15. doi : 10.1111/cmi.12028.

Fernandez-Vidal A, Arnaud LC, Maumus M, *et al*. 2019. Exposure to the Fungicide Captan Induces DNA Base Alterations and Replicative Stress in Mammalian Cells. *Environ Mol Mutagen*. 60 :286–297. doi : 10.1002/em.22268.

Fogg PCM, Saunders JR, McCarthy AJ, *et al*. 2012. Cumulative effect of prophage burden on Shiga toxin production in *Escherichia coli*. *Microbiology* 158 :488-497. doi : 10.1099/mic.0.054981-0.

Foroud NA, Baines D, Gagkaeva TY, *et al*. 2019. Trichothecenes in Cereal Grains – An Update. *Toxins (Basel)* 11 :634. doi : 10.3390/toxins11110634.

Garnica M, Nouér SA, Pellegrino FL, *et al*. 2013. Ciprofloxacin prophylaxis in high risk neutropenic patients : effects on outcomes, antimicrobial therapy and resistance. *BMC Infect Dis*. 13 :356. doi : 10.1186/1471-2334-13-356.

Garofalo M, Payros, D, Oswald E, *et al*. 2022. The foodborne contaminant deoxynivalenol exacerbates DNA damage caused by a broad spectrum of genotoxic agents, *STOTEN*. 820 :153280. doi : 10.1016/j.scitotenv.2022.153280.

- Garofalo M**, Payros D, Penary M, *et al.* 2023. A novel toxic effect of foodborne trichothecenes : the exacerbation of genotoxicity. *Environ Pollut.* 18 :317 :120625. doi : 10.1016/j.envpol.2022.120625.
- Garreau de Loubresse N, Prokhorova I, Holtkamp W, *et al.* 2014. Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome. *Nature.* 513 :517–522. doi : 10.1038/nature13737.
- Ge Z, Feng Y, Ge L, *et al.* 2017. *Helicobacter hepaticus* cytolethal distending toxin promotes intestinal carcinogenesis in 129Rag2-deficient mice. *Cell Microbiol.* 19 :10111. doi : 10.1111/cmi.12728.
- Ghysel M-H, Trotin F. 2004. Hallucinogen alkaloid derivatives from Ergot and Morning Glory. *Ann Toxicol Anal* 16 :65–75. doi :10.1051/ata/2004026.
- Gill A, Dussault F, McMahon T, *et al.* 2022. Characterisation of atypical Shiga toxin gene sequences and description of Stx2j, a new subtype. *J Clin Microbiol.* 28 :jcm0222921. doi : 10.1128/jcm.02229-21.
- Gomez SA, Abrey-Recalde MJ, Panek CA, *et al.* 2013. The oxidative stress induced *in vivo* by Shiga toxin-2 contributes to the pathogenicity of haemolytic uraemic syndrome. *Clinical and Experimental Immunology.* 173 :463–472. doi : 10.1111/cei.12124.
- Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, *et al.* 2019. Cellular Senescence : Defining a Path Forward. *Cell.* 179 :813–827. doi : 10.1016/j.cell.2019.10.005.
- Goyle S, Maraveyas A. 2005. Chemotherapy for Colorectal Cancer. *Dig. Surg.* 22 :401-414. doi : 10.1159/00009144.
- Gruber-Dorninger C, Jenkins T, Schatzmayr G. 2019. Global Mycotoxin Occurrence in Feed : A Ten-Year Survey. *Toxins (Basel).* 11 :375. doi : 10.3390/toxins11070375.
- Gudkov AV, Gurova KV, Komarova EA. 2011. Inflammation and p53 : A Tale of Two Stresses. *Genes & Cancer.* 2 :503–516. doi : 10.1177/1947601911409747.
- Guéraud F. 2017. 4-Hydroxynonenal metabolites and adducts in pre-carcinogenic conditions and cancer. *Free Radical Biology and Medicine.* 111 :196–208. doi : 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.025.
- Guidi R, Guerra L, Levi L, *et al.* 2013. Chronic exposure to the cytolethal distending toxins of Gram-negative bacteria promotes genomic instability and altered DNA damage response. *Cell Microbiol.* 15 :98-113. doi : 10.1111/cmi.12034.
- He Z, Gharaibeh RZ, Newsome RC, *et al.* 2018. *Campylobacter jejuni* promotes colorectal tumorigenesis through the action of cytolethal distending toxin. *Gut.* 2 :289-300. doi : 10.1136/gutjnl-2018-317200.
- Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, *et al.* 1999. A Proinflammatory Cytokine Inhibits P53 Tumor Suppressor Activity. *Journal of Experimental Medicine.* 190 :1375–1382. doi : 10.1084/jem.190.10.1375

Huybrechts K, Claeys L, Ferrari P, *et al.* 2019. Impact of chronic multi-mycotoxin dietary exposure on colorectal and liver cancer risk in Europe. *World Mycotoxin Forum - Book of Abstracts*, p. 70.

IARC monographs, 2019. IARC monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans – preamble. Consulted on February 2023 (<https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2019/07/Preamble-2019.pdf>).

Ibler AEM, ElGhazaly M, Naylor KL, *et al.* 2019. Typhoid toxin exhausts the RPA response to DNA replication stress driving senescence and *Salmonella* infection. *Nat Commun* 10 :4040. doi : 10.1038/s41467-019-12064-1.

Iordanov MS, Pribnow D, Magun JL, *et al.* 1997. Ribotoxic Stress Response : Activation of the Stress-Activated Protein Kinase JNK1 by Inhibitors of the Peptidyl Transferase Reaction and by Sequence-Specific RNA Damage to the a-Sarcin/Ricin Loop in the 28S rRNA. *Mol cell biol.* 17 :3373-81. doi : 10.1128/MCB.17.6.3373.

Ismaeel, AY, Senok AC, Bindayna KM, *et al.* 2005. Effect of antibiotic sub inhibitory concentration on cytolethal distending toxin production by *Campylobacter jejuni*. *Journal of Infection.* 51 :144–149. doi : 10.1016/j.jinf.2004.09.012.

Israel-Roming F, Avram M. 2010. Deoxynivalenol stability during wheat processing. *Romanian Biotechnological Letters* 15 :47-53.

Jackson SP, Bartek J. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* 461 :1071–1078. doi : 10.1038/nature08467

Janka A, Bielaszewska M, Dobrindt U, *et al.* 2003. Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 :H- and O157 :H7 : characterization and evolutionary considerations. *Infect Immun.* 71 :3634-8. doi : 10.1128/IAI.71.6.3634-3638.2003.

Jenkins GJ, Zaïr Z, Johnson GE, Doak SH. 2010. Genotoxic thresholds, DNA repair, and susceptibility in human populations. *Toxicology.* 278 :305-10. doi : 10.1016/j.tox.2009.11.016.

Jin, J., Jiang, DZ., Mai, WY. *et al.* Homoharringtonine in combination with cytarabine and aclarubicin resulted in high complete remission rate after the first induction therapy in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 20 :1361–1367. doi : 10.1038/sj.leu.2404287

Johnson WM, Lior H. 1998. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb Pathog.* 4 :115-26. doi : 10.1016/0882-4010(88)90053-8.

Kantarjian HM, Talpaz M, Santini V, *et al.* 2000. Homoharringtonine : History, current research, and future directions. *Cancer* 92 :1591–1605. doi : 10.1002/1097-0142

Koch C, Hertwig S, Lurz R, *et al.* 2001. Isolation of a lysogenic bacteriophage carrying the stx(1(OX3)) gene, which is closely associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

- strains from sheep and humans. *J Clin Microbiol.* 39 :3992–3998. doi : 10.1128/JCM.39.11.3992-3998.2001.
- Kunsmann, L, Rüter C, Bauwens A, *et al.* 2015. Virulence from vesicles : Novel mechanisms of host cell injury by *Escherichia coli* O104 :H4 outbreak strain. *Sci. Rep.* 5 : 13252. doi : 10.1038/srep13252.
- Madic J, Vingadassalon N, de Garam CP, *et al.* 2011. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26 :H11, O103 :H2, O111 :H8, O145 :H28, and O157 :H7 in raw-milk cheeses by using multiplex real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 77 :2035-41. doi : 10.1128/AEM.02089-10.
- Maredia R, Devineni N, Lentz P, *et al.* 2012. Vesiculation from *Pseudomonas aeruginosa* under SOS. *Scientific World Journal.* 2012 :402919. doi : 10.1100/2012/402919.
- Maresca M, Pinton P, Ajandouz *et al.* 2021. Overview and Comparison of Intestinal Organotypic Models, Intestinal Cells, and Intestinal Explants Used for Toxicity Studies. *Curr Top Microbiol Immunol.* 430 :247-264. doi : 10.1007/82_2018_142.
- Martin O, Scholze M, Ermler S, *et al.* 2021. Ten years of research on synergisms and antagonisms in chemical mixtures : A systematic review and quantitative reappraisal of mixture studies. *Environment International* 146 :106206. doi : 10.1016/j.envint.2020.106206.
- McBroom AJ, Kuehn MJ, *et al.*, 2007. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol. Microbiol.* 63 :545-58. doi : 10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x.
- McGannon CM, Fuller CA, Weiss AA. 2010. Different classes of antibiotics differentially influence shiga toxin production. *Antimicrob Agents Chemother.* 54 :3790–3798. doi : 10.1128/AAC.01783-09.
- McCormick SP, Stanley AM, Stover NA, Alexander NJ. 2011. Trichothecenes : From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins (Basel)* 3 :802–814. doi : 3390/toxins3070802.
- Mehta A, Haber JE. 2014. Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6 : a016428. doi : 10.1101/cshperspect.a016428.
- Michalska M, Wolf P. 2015. *Pseudomonas* Exotoxin A : optimized by evolution for effective killing. *Front Microbiol* 6 :75. doi : 10.3389/fmicb.2015.00963.
- Mikhed Y, Görlach A, Knaus UG, *et al.* 2015. Redox regulation of genome stability by effects on gene expression, epigenetic pathways and DNA damage/repair. *Redox Biology.* 5 :275–289. doi : 10.1016/j.redox.2015.05.008.
- Mishra S, Dwivedi PD, Pandey HP, *et al.* 2014. Role of oxidative stress in Deoxynivalenol induced toxicity. *Food Chem Toxicol.* 72 :20-9. doi : 10.1016/j.fct.2014.06.027.

- Mora A, López C, Dhabí G, *et al.* 2012. Seropathotypes, Phylogroups, Stx subtypes, and intimin types of wildlife-carried, shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains with the same characteristics as human-pathogenic isolates. *Applied and environmental microbiology* 8 : 2578-85. doi : 10.1128/AEM.07520-11.
- Moritz E, Pauly K, Bravard A, *et al.* 2014. hOGG1-Cys326 variant cells are hypersensitive to DNA repair inhibition by nitric oxide. *Carcinogenesis*. 35 :1426–1433. doi : 10.1093/carcin/bgu066.
- Murphy MP. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*. 417 :1–13. doi : 10.1042/BJ20081386.
- Muruzabal D, Sanz-Serrano J, Sauvaigo S, *et al.* 2021. Validation of the *in vitro* comet assay for DNA cross-links and altered bases detection. *Arch Toxicol*. 95 :2825–2838. 10.1007/s00204-021-03102-3.
- Nakajima H, Kiyokawa N, Katagiri YU *et al.* 2001. Kinetic analysis of binding between Shiga toxin and receptor glycolipid Gb3Cer by surface plasmon resonance. *J Biol Chem*. 276 :42915-22. doi : 10.1074/jbc.M106015200.
- Ndlovu S, Nagiah S, Abdul NS, *et al.* 2021. Deoxynivalenol downregulates NRF2-induced cytoprotective response in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Toxicon* 193 :4–12. doi : 10.1016/j.toxicon.2021.01.017.
- Nguyen Y, Sperandio V. 2012. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2 :90. doi : 10.3389/fcimb.2012.00090.
- Nougayrede J-P, Homburg S, Taieb F, *et al.* 2006. *Escherichia coli* Induces DNA Double-Strand Breaks in Eukaryotic Cells. *Science* 313 :848–851. doi : 10.1126/science.1127059.
- Olvera A, Carter H, Rajan A, *et al.* 2021. Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection in Cancer and Immunosuppressed Patients. *Clin Infect Dis*. 10 :e620-e629 doi : 10.1093/cid/ciaa1394.
- Peres SY, Marchès O, Daigle F, *et al.* 1997. A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol. Microbiol*. 24:1095-1107. doi : 10.1046/j.1365-2958.1997.4181785.x.
- Pestka JJ. 2010. Deoxynivalenol-Induced Proinflammatory Gene Expression : Mechanisms and Pathological Sequelae. *Toxins*. 2 :1300–1317. doi : 10.3390/toxins2061300.
- Petruzzello-Pellegrini TN, Moslemi-Naeini M, Marsden PA. 2013. New insights into Shiga toxin-mediated endothelial dysfunction in hemolytic uremic syndrome. *Virulence*. 4 :556-63. doi : 10.4161/viru.26143.

Pickett CL, Cottle DL, Pesci EC, *et al.* 1994. Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes. *Infect. Immun.* 62:1046-1051. doi : 10.1128/iai.62.3.1046-1051.1994.

Pinton P, Oswald IP. 2014. Effect of Deoxynivalenol and Other Type B Trichothecenes on the Intestine : A Review. *Toxins (Basel)*. 6 :1615-43. doi : 10.3390/toxins6051615.

Pierard D. 1998. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol.* 36 :3317–3322. doi : 10.1128/JCM.36.11.3317-3322.

Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P. 2010. H2AX Phosphorylation : Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J Nucleic Acids.* 2010 :920161. doi : 10.4061/2010/920161.

Platnich JM, Chung H, Lau A, *et al.* 2018. Shiga Toxin/Lipopolysaccharide Activates Caspase-4 and Gasdermin D to Trigger Mitochondrial Reactive Oxygen Species Upstream of the NLRP3 Inflammasome. *Cell Reports.* 25 :1525-1536.e7. doi : 10.1016/j.celrep.2018.09.071.

Pleguezuelos-Manzano C, Puschhof J, Rosendahl Huber A, *et al.* 2020. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks⁺ *E. coli*. *Nature.* 580 :269-273. doi : 10.1038/s41586-020-2080-8.

Pommier Y. 2006. Topoisomerase I inhibitors : camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer.* 6 :789–802. doi : 10.1038/nrc1977.

Poschl G. 2004. Alcohol and cancer. *Alcohol and Alcoholism.* 39 :155–165. doi : 10.1093/alcalc/agh057.

Presutti R, Harris SA, Kachuri L, *et al.* 2016. Pesticide exposures and the risk of multiple myeloma in men : An analysis of the North American Pooled Project : Pesticide exposures and the risk of multiple myeloma. *Int J Cancer.* 139 :1703–1714. doi : 10.1002/ijc.30218.

Prokhorova I, Altman RB, Djumagulov M, *et al.* 2017. Aminoglycoside interactions and impacts on the eukaryotic ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 114 : e10899-e10908. doi : 10.1073/pnas.1715501114.

Putze J, Hennequin C, Nougayrede J-P, *et al.* 2009. Genetic Structure and Distribution of the Colibactin Genomic Island among Members of the Family Enterobacteriaceae. *Infection and Immunity* 77 :4696–4703. doi : 10.1128/IAI.00522-09.

Ranjbar R, Masoudimanesh M, Dehkordi FS, *et al.* 2017. Shiga (Vero)-toxin producing *Escherichia coli* isolated from the hospital foods ; virulence factors, o-serogroups and antimicrobial resistance properties. *Antimicrob Resist Infect Control.* 7-6 :4. doi : 10.1186/s13756-016-0163-y.

- Richard JL. 2008. Discovery of aflatoxins and significant historical features. *Toxin Reviews*. 27 :171–201. doi : 10.1080/15569540802462040.
- Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, *et al.* 2017. Proteobacteria : A Common Factor in Human Diseases. *BioMed Research International* 2017 :1–7. doi : 10.1155/2017/9351507.
- Rompikuntal PK, Thay B, Khan MK, *et al.*, 2012. Perinuclear localization of internalized outer membrane vesicles carrying active cytolethal distending toxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 80 :31–42. doi : 10.1128/IAI.06069-11.
- Saenz JB, Li J, Haslam DB. 2010. The MAP kinase-activated protein kinase 2 (MK2) contributes to the Shiga toxin-induced inflammatory response. *Cellular Microbiology*. 12 :516–529. doi : 10.1111/j.1462-5822.2009.01414.x.
- Sandvig K, Bergan J, Dyve AB *et al.* 2010. Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin. *Toxicon*. 56 :1181-5. doi : 10.1016/j.toxicon.2009.11.021.
- Scheer D, Benighaus C, Benighaus L, *et al.* 2014. The Distinction Between Risk and Hazard : Understanding and Use in Stakeholder Communication : Distinction Between Risk and Hazard. *Risk Analysis*. 34 :1270–1285. doi : 10.1111/risa.12169.
- 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.” *Toxicology Letters*. 153 :133–143. doi : 10.1016/j.toxlet.2004.04.045.
- Scuron MD, Boesze-Battaglia K, Dlakić M, *et al.* 2016. The Cytolethal Distending Toxin Contributes to Microbial Virulence and Disease Pathogenesis by Acting As a Tri-Perditious Toxin. *Front Cell Infect Microbiol*. 6 :168. doi : 10.3389/fcimb.2016.00168.
- Swift LH, Golsteyn RM. 2014. Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *Int J Mol Sci*. 15 :3403-31. doi : 10.3390/ijms15033403.
- Seitz HK, Stickel F. 2010. Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development : role of genetics in ethanol metabolism. *Genes Nutr*. 5 :121–128. doi : 10.1007/s12263-009-0154-1.
- Scott DA, Kaper JB. 1994. Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. *Infect. Immun*. 62:244-251. doi : 10.1128/iai.62.1.244-251.1994.
- Schmidt H, Kernbach C, Karch H. 1996. Analysis of the EHEC hly operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 :H7. *Microbiology*. 142 :907–914. doi : 10.1099/00221287-142-4-907.
- Schmidt H, Scheef J, Morabito S, *et al.* 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol*. 66 :1205-1208.

Shimizu T, Ohta Y, Noda M. 2009. Shiga toxin 2 is specifically released from bacterial cells by two different mechanisms. *Infect Immun.* 77 :2813-2823. doi : 10.1128/IAI.00060-09.

Soysal N, Mariani-Kurkdjian P, Smail Y, *et al.* 2016. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Hybrid Pathotype O80 :H2 as a New Therapeutic Challenge. *Emerg Infect Dis.* 22 :1604-12. doi : 10.3201/eid2209.160304.

Ståhl AL, Arvidsson I, Johansson KE, *et al.* 2015. A novel mechanism of bacterial toxin transfer within host blood cell-derived microvesicles. *PLoS Pathog.* 11 :e1004619. doi : 10.1371/journal.ppat.1004619.

Taieb F, Petit C, Nougayrède J-P, *et al.* 2016. The Enterobacterial Genotoxins : Cytolethal Distending Toxin and Colibactin. *EcoSal Plus.* 7(1). doi :10.1128/ecosalplus.ESP-0008-2016.

Tóth, I, Héroult F, Beutin L, *et al.* 2003. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources : establishment of the existence of a new cdt variant (type IV). *J. Clin. Microbiol.* 41:4285-4291. doi : 10.1128/JCM.41.9.4285-4291.2003.

Tumer NE, Li XP. 2012. Interaction of ricin and Shiga toxins with ribosomes. *Curr Top Microbiol Immunol.* 357 :1-18. doi : 10.1007/82_2011_174.

Tyler SD, Johnson WM, Lior H, *et al.* Identification of verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 29 :1339–1343. doi : 10.1128/jcm.29.7.1339-1343.1991.

Ueno Y, Ohara M, Kawamoto T, *et al.*, 2006. Biogenesis of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin holotoxin. *Infect Immun.* 74 :3480-7. doi : 10.1128/IAI.00739-05.

van Egmond HP, Schothorst RC, Jonker MA. 2007. Regulations relating to mycotoxins in food : Perspectives in a global and European context. *Anal Bioanal Chem,* 389 :147–157. doi : 10.1007/s00216-007-1317-9.

Vin K, Rivière G, Leconte S, *et al.* 2020. Dietary exposure to mycotoxins in the French infant total diet study. *Food Chem Toxicol.* 140 :111301. doi : 10.1016/j.fct.2020.111301.

Vind AC, Snieckute G, Blasius M, *et al.* 2020. ZAK α Recognizes Stalled Ribosomes through Partially Redundant Sensor Domains. *Molecular Cell.* 78 :700-713.e7. doi : 10.1016/j.molcel.2020.03.021.

Wang W, Zhu Y, Abraham N, *et al.* 2021. The Ribosome-Binding Mode of Trichothecene Mycotoxins Rationalizes Their Structure—Activity Relationships. *IJMS.* 22 :1604. doi : 10.3390/ijms22041604.

Wells L, Hardie L, Williams C, *et al.* 2017. Deoxynivalenol Biomarkers in the Urine of UK Vegetarians. *Toxins (Basel)* 9 :196. doi : .10.3390/toxins9070196.

Wild CP. 2005. Complementing the Genome with an “Exposome” : The Outstanding Challenge of Environmental Exposure Measurement in Molecular Epidemiology. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 14 :1847–1850. doi : 10.1158/1055-9965.EPI-05-0456.

Wild CP. 2012. The exposome : from concept to utility. *Int J Epidemiol*. 41 :24–32. doi : 10.1093/ije/dyr236.

Wilson MR, Jiang Y, Villalta PW, *et al.* 2019. The human gut bacterial genotoxin colibactin alkylates DNA. *Science*. 363 :eaar7785. doi : 10.1126/science.aar7785.

World Health Organization. 2015. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases : foodborne disease burden epidemiology reference group 2007–2015. *World Health Organization, Geneva, Switzerland*.

Wu F. 2007. Measuring the economic impacts of *Fusarium* toxins in animal feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 137 : 363-374. doi : 10.1016/j.anifeedsci.2007.06.010.

Wu F. 2015. Global impacts of aflatoxin in maize : trade and human health. *Animal Feed Science and Technology*. 8 :137-142. doi : 10.3920/WMJ2014.1737.

Wu Q, Dohnal V, Kuca K, Yuan Z. 2013. Trichothecenes : Structure-Toxic Activity Relationships. *Curr Drug Metab* 641–60. doi : 10.2174/1389200211314060002.

Xue M, Wernke KM, Herzon SB. 2020. Depurination of colibactin-derived interstrand cross-links. *Biochemistry*. 59 : 892-900. doi : 10.1101/869313.

Zhang X, McDaniel AD, Wolf LE, *et al.* 2000. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis*. 181 :664-70. doi : 10.1086/315239.

Zhang J, Geng H, Liu L, Zhang H. 2019. Synergistic cytotoxicity of homoharringtonine and etoposide in acute myeloid leukemia cells involves disrupted antioxidant defense. *CMAR*. 11 :1023–1032. doi : 10.2147/CMAR.S187597.

Zhang X, Li J, Sejas DP, *et al.* 2004. The Fanconi Anemia Proteins Functionally Interact with the Protein Kinase Regulated by RNA (PKR). *J Biol Chem*. 279 :43910–43919. doi :10.1074/jbc.M403884200.

Zhou DC, Zittoun R, Marie JP. 1995. Homoharringtonine : an effective new natural product in cancer chemotherapy. *Bull Cancer*. 82 :987-95.

Zhou H-R, He K, Landgraf J, *et al.* 2014. Direct Activation of Ribosome-Associated Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase (PKR) by Deoxynivalenol, Anisomycin and Ricin : A New Model for Ribotoxic Stress Response Induction. *Toxins* 6 :3406–3425. 10.3390/toxins6123406.

ANNEXES

Annexe I :

Ribosome : an Achilles' heel for the cell and a target for natural toxins

Tableaux 1 à 6

Table 1 - Consequences of ribosome inhibition on inflammation

Toxin	Experimental model	Conditions	Effect	Reference
<i>In vitro</i>				
Shiga toxin	Human monocytes (differentiated THP1 cells)	24h exposure to 400 ng/mL of Stx1	MAPK-dependant TNF α and IL-1 β expression	Cherla <i>et al.</i> , 2009
	Primary human peripheral blood monocytes	18h exposure to 100 ng/mL of Stx1 and Stx2	TNF- α and GM-CSF release	Cameron <i>et al.</i> , 2003
	U937 (monocytes)	12h exposure to 0.5 - 1 μ g/mL of Stx1	PKR-dependant IL-8 induction	Gray <i>et al.</i> , 2008
	Human intestinal epithelial cells HCT8	4h exposure to 1 μ g/mL of Stx2	IL-8 and IL-1 β induction	Jandhyala <i>et al.</i> , 2008
	HUVEC (umbilical vein endothelial cells)	4h and 24h exposure to 1/10 of IC50 doses of Stx1 and Stx2	Induction of pro-inflammatory genes (mRNA analysis)	Matussek <i>et al.</i> , 2003
	THP1 cells (human macrophages)	6h exposure to 2 to 200 ng/mL of Stx2	Non canonical and canonical inflammasome activation	Platnich <i>et al.</i> , 2018
	Human peripheral blood monocytes	18h exposure to 400 ng/mL of Stx	TNF- α and IL-1 β induction	Ramegowda <i>et al.</i> , 1996
	Human monocytes	24h exposure to 10 nM of Stx1	IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α induction	van Setten <i>et al.</i> , 1996
	Human intestinal epithelial cells HCT8	4h exposure to 1-100 μ g/mL of Stx1	Induction of IL-8 and GRO- α mRNA	Thorpe <i>et al.</i> , 2001
	Human intestinal epithelial cells HCT8	1h-4h exposure to 1 μ g/mL Stx2	Superinduction of flagellin-mediated IL-8 mRNA	Jandhyala <i>et al.</i> , 2010
	THP1 cells (human macrophages)	2h exposure to 400 ng/mL Stx1	Nuclear translocation of NFK- κ B	Sakiri <i>et al.</i> , 1998
	THP1 cells (human macrophages)	12h exposure to 200-600 ng/mL Stx1	TNF production	
	Vero cells	1 to 240mn exposure to producing-Stx <i>E. coli</i> culture supernatant	NF- κ B family members DNA binding	Cameron <i>et al.</i> , 2002
	HK-2 cells (human renal tubule epithelial cells)	15 to 240mn exposure to 75 μ g/mL of Stx1 or Stx2	Cytokine and chemokine production	Lentz <i>et al.</i> , 2011
	HUVEC (umbilical vein endothelial cells)	1h exposure to 25 pM to 1 nM of Stx2	NF- κ B dependant up regulation of IL-8 and mcp-1	Zoja <i>et al.</i> , 2002
<i>In vivo</i>				
	Sera of patients with <i>E. coli</i> O157:H7-caused HUS	-	Elevated IL-6, IL-8, IL-10 levels	Yamamoto <i>et al.</i> , 2000
	Mouse	2 to 72h exposure to 225 ng/kg Stx2 (intreaperitoneal)	Overexpression of cytokines and chemokines	Keepers <i>et al.</i> , 2006
	Sera of children with HUS	-	Elevated TNF- α levels	Lopez <i>et al.</i> , 1995
Deoxynivalenol	Hypoxia, oxidative stress and immune evasion: a trinity of the trichothecenes T-2 toxin and deoxynivalenol			You <i>et al.</i> , 2021 *
	Deoxynivalenol: Mechanisms of action and its effects on various terrestrial and aquatic species			Hoofst <i>et al.</i> , 2021 *
	The compromised intestinal barrier induced by mycotoxins			Gao <i>et al.</i> , 2020 *
	DON-induced proinflammatory gene expression: mechanisms and pathological sequelae			Pestka, 2010 *
	Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms			Payros <i>et al.</i> , 2016 *
	Effect of deoxynivalenol and other Type B trichothecenes on the intestine: a review			Pinton & Oswald, 2014 *
Trichothecenes: immunomodulatory effects, mechanisms and anti-cancer potential			Wu <i>et al.</i> , 2017 *	

*In this section, only review are cited due to a large amount of studies on various experimental model

Table 2 - Consequences of ribosome inhibition on cell death and apoptosis

Toxin	Experimental model	Conditions	Effect	Reference
<i>In vitro</i>				
	T47 breast cancer cells	24h exposure to IC50 doses of Stx	44.4% of apoptotic cells (acridine orange/ethidium bromide) 14.7 % of necrotic cells (acridine orange/ethidium bromide)	Pinatih <i>et al.</i> , 2021
	Human epithelial cells HCT8	4h and 6h exposure to 1 µg/mL of Stx1	MAPK activation leading to apoptosis (caspase 3 cleavage)	Smith <i>et al.</i> , 2003
	Renal proximal tubular epithelial cells (HRPTEC)	48h exposure to 100 pM of Stx	Apoptosis (TUNEL labelling, DNA fragmentation)	Kodama <i>et al.</i> , 1999
	Human renal tubular epithelial cells (HRTEC)	24h exposure to 100 pg/mL of Stx	Apoptosis (Morphological changes (TEM), DNA fragmentation)	Karpman <i>et al.</i> , 1998
	Human laryngeal epithelial cells (HEp-2)	24h exposure to 10 ng/mL of Stx1	Apoptosis Caspases 3, 8 and 9 activation, cleavage of PARP3 (activation of proapoptotic factors) Low level of necrosis (1-5%) (uptake of ethidium bromide, nuclear morphology)	Ching <i>et al.</i> , 2002
Shiga toxin	Human cervical epithelial cells (HeLa)	4h exposure to 10 ng/mL of Stx1	Apoptosis (Caspases 3, 6, 8, 9 activation; TUNEL labelling, DNA fragmentation)	Fuji <i>et al.</i> , 2003
	Human foreskin microvascular endothelial cells (FMVEC)	4h to 24h exposure to 0.1 pM to 10 nM of Stx	Cytotoxicity, apoptosis (flow cytometry, fluorescence microscopy)	Pijpers <i>et al.</i> , 2001
	THP1 cells (human macrophages)	1, 2, and 6h exposure to 200 ng/mL of Stx2	Pyroptosis (caspase-4 cleavage, GSDMD, GAPDH and LDH release)	Platnich <i>et al.</i> , 2018
	THP1 cells (human macrophages)	6h exposure to 400 ng/mL of Stx1	Apoptosis through caspase-8 and 3 activation	Lee <i>et al.</i> , 2005
<i>In vivo</i>				
	Renal biopsies from children with HUS	-	Apoptosis and necrosis (TUNEL labelling)	Karpman <i>et al.</i> , 1998
	3-week-old weanling pigs	Infection with Stx 2e-producing <i>E. coli</i> strain isolated from edema disease	Necrosis in brain endothelial cells	Kausche <i>et al.</i> , 1992
	Mice	Infection with Stx-producing <i>E. coli</i> strain	Acute renal cortical tubular necrosis	Wadolkowski <i>et al.</i> , 1990
	Weaned pigs	Infection with Stx2e-producing <i>E. coli</i> strain for 14-15 days	Vascular necrosis	Matise <i>et al.</i> , 2003
		Hypoxia, oxidative stress and immune evasion: a trinity of the trichothecenes T-2 toxin and deoxynivalenol		You <i>et al.</i> , 2021 *
		Cytotoxicity of Mycotoxins and Their combination on different cell lines = a review		Skrzydlewski <i>et al.</i> , 2022 *
Deoxynivalenol		Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms		Payros <i>et al.</i> , 2016 *
		Role of oxydative stress in deoxynivalenol induced toxicity		Mishra <i>et al.</i> , 2014 *

*In this section, only review are cited due to a large amount of studies on various experimental model

Table 3 - Consequences of ribosome inhibition on oxidative stress

Toxin	Experimental model	Conditions	Effect	Reference
In vitro				
Shiga toxin	THP1 cells (human macrophages)	6h exposure to 2 to 200 ng/mL of Stx2	Mitochondrial ROS production	Platnich <i>et al.</i> , 2018
	In vivo			
	Kidney of mice	72h exposure to 2.5 ng/mice of Stx2 (intravenous)	Increase of the MDA concentration, reduction of the GSH content, lipid peroxidation - protective effect of antioxidants	Gomez <i>et al.</i> , 2013
Ex vivo				
	pig intestinal explants	10 µM DON, 4 h	upregulation of NFκB genes, downregulation of Thioredoxin reductase	Alassane Kpembé <i>et al.</i> , 2018
In vitro				
Deoxynivalenol	Caco2 cells	5 - 40 µM DON, 24 h	Increase of MDA production	Kouadio <i>et al.</i> , 2005
	HepG2	10 µM DON, 4 h	Increase CAT and SOD2 gene expression, decrease of HMOX1 gene expression	Hasuda <i>et al.</i> , 2022
		15 - 60µM, 1 h	increase level of ROS production	Zhang <i>et al.</i> , 2009
	rat liver clone 9 cells	0,1 to 25 µg/mL	increase DHDCF fluorescence	Sahu <i>et al.</i> , 2010
		0,1 - 25µg/mL	increase DHDCF fluorescence	
		0 - 100µg/mL, 48 h	Increase DHDCF oxydation measurement	Sahu <i>et al.</i> , 2008
	human embryonic HEK-293 cells	2,5 - 5 µM, 6 to 24 h	Increase superoxide dismutase activity, modulation of catalase activity, temporary activation of glutathione peroxidase and glutathione reductase	Dinu <i>et al.</i> , 2011
HT29	250 - 500 ng/mL DON, 30 min	decrease GSH protein and increase DCF fluorescence and intracellular ROS generation	Krishnaswamy <i>et al.</i> , 2010	

Table 4 - Consequences of ribosome inhibition on cell cycle arrest

Toxin	Experimental model	Conditions	Effect	Reference
In vitro				
Shiga toxin	LoVo cells (human epithelial colorectal cancer cells)	4 days exposure to OMVs to 5 µg/mL OMVs from <i>E. coli</i> O157:H7	G0/G1 phase arrest (flow cytometry)	Tyrer <i>et al.</i> , 2014
	HCT116 (human epithelial colorectal cancer cells)	18, 24 and 48h exposure to 5 ng/mL of Stx	S phase arrest (flow cytometry)	Bhattacharjee <i>et al.</i> , 2005
In vivo				
	Mouse skin	336 and 672 nmol of deoxynivalenol single topical (skin) application 24 h	Decrease of CDK-2, CDK-4, cyclin D, cyclin A and cyclin E Cell cycle arrest in G0 phase	Mishra <i>et al.</i> , 2016
Ex vivo				
	Primary mouse endometrial stromal cells	100 to 1600 ng/mL 24 h	Decrease of cell-cycle related protein expression p38/p-p38, cdc25c/p-cdc25c, cdc2/p-cdc2, cyclin B1 G2 cell cycle arrest	Dai <i>et al.</i> , 2017
In vitro				
Deoxynivalenol	HaCat cells (immortalized human keratinocyte)	0,84 to 3,37 nmol/mL 24 h	cell cycle phase arrest in G0/G1 phase Increase the proportion of cells in G0/G1 phase and Decrease S phase	Mishra <i>et al.</i> , 2016
	Caco-2	0,5 µM deoxynivalenol 24 h	Transcriptomic analysis regulation of 33 genes involved in the cell cycle arrest specially in the G1-S phase - upregulation of ATM	He <i>et al.</i> , 2021
	DF-1 cells	100 - 2000 ng/mL 24 h	G2/M cell cycle arrest	Li <i>et al.</i> , 2014
	Mouse astrocytes C8-D1A astrocytes type 1	1 - 10 µM deoxynivalenol 24 h	G1 phase arrest	Fæste <i>et al.</i> , 2022
	IEC-6	5 - 80 µM	Decrease cyclic adenosine monophosphate cAMP	Bianco <i>et al.</i> , 2012
	HCT116	500 to 1000 ng/mL 48 h	No significant effect on cell cycle phase distribution	
	Non transformed intestinal cells 407	250 to 1000 ng/mL 48 h	G2/M cell cycle arrest	Yang <i>et al.</i> , 2008
	HepG2	0 - 4 µg/mL 6 to 48 h 0,6 to 4,8 µM 48 h	G2/M cell cycle arrest through the induction of EGR1 G0/G1 and G2/M cell cycle arrest	Yuan <i>et al.</i> , 2018 Juan-Garcia <i>et al.</i> , 2018
	Human hepatic epithelial cells (L-02 cells)		Decrease G0/G1 phase	
	Human tubular epithelial cells (HK-2 cells)	800 ng/mL DON 24 h	Increase G0/G1 cell cycle arrest	Lei <i>et al.</i> , 2017
Human chondrocytes C28/12		Increase G2/M cell cycle arrest		

Table 5 - Consequences of ribosome inhibition on endoplasmic reticulum stress

Toxin	Experimental model	Conditions	Effect	Reference	
<i>In vitro</i>					
Shiga toxin	THP1 cells (human macrophages)	2h exposure to 400 ng/mL of Stx1	Activation of UPR effectors (PERK, IRE-1, ATF6)	Lee <i>et al.</i> , 2008	
	HBMEC cells (human brain microvascular HK-2 cells)	19h exposure to 10 ng/mL Stx2	Upregulation of UPR effectors mRNA (CHOP, ATF-4)	Fujii <i>et al.</i> , 2008	
	(human renal tubule epithelial cells)	1 to 24h exposure to 75 pg/mL of Stx1 or Stx2Stx1 and Stx2	Activation of UPR effectors (PERK, IRE-1 ATF6)	Lentz <i>et al.</i> , 2011	
	Caco-2 cells ARPE-19 cells (human retinal pigment epithelial)	4h exposure to 30 ng/mL of Stx2 1-12h exposure to 100 ng/mL Stx1 or 10 ng/mL Stx2	ER stress-related cell death Activation of UPR effectors (PERK, IRE-1, CHOP)	Tang <i>et al.</i> , 2015 Park <i>et al.</i> , 2017	
<i>Ex vivo</i>					
Deoxynivalenol	primary peritoneal murine macrophages	0,01 to 0,5 µg/mL deoxynivalenol 1 to 12 h	Degradation of GRP (Glucose regulated protein) 78	Shi <i>et al.</i> , 2009	
	pig liver slices	10 µM DON, 4H	increase of ATF3 gene expression	Hasuda <i>et al.</i> , 2022	
	<i>In vitro</i>				
	IPEC-1	0,5 µg/mL	Increased mRNA expression of XBP-1 and TRAF-1, markers of endoplasmic reticulum stress	Lin <i>et al.</i> , 2021	
bovine mammary epithelial cells	1,0 µg/mL deoxynivalenol 6 h	Translocation of IGFBP-3 into the nucleus Lead to intrinsic apoptosis pathway in cells	Agostini-Dreyer <i>et al.</i> , 2019		
Jurkat T cells	0,5 µM deoxynivalenol 6 h exposure	ER stress activation and Upregulation of genes involved in ER stress-related apoptosis and transcription factors as NFκB	Katika <i>et al.</i> , 2015		

Table 6 - Consequences of ribosome inhibition on autophagy

Toxin	Experimental model	Conditions	Effect	Reference
Shiga toxin	THP1 cells (human macrophages)	0-16h exposure to 400-800 ng/mL of Stx1 B subunit	LC3B-I to LC3B-II conversion, GFP-LC3 aggregation, Atg5 and Beclin-1 cleavage	Lee <i>et al.</i> , 2011
	Caco-2 cells	24h exposure to 1-40 ng/mL of Stx2	LC3B-I to LC3B-II conversion, GFP-LC3 aggregation	Tang <i>et al.</i> , 2015
Deoxynivalenol	IPEC-J1 cells	0 - 16 µM deoxynivalenol, 24 h	LC3B-I to LC3B-II conversion, GFP-LC3 aggregation, Atg5 and Beclin-1 cleavage	Liu <i>et al.</i> , 2022
	IPEC-J2 cells	co-exposure 4 µM deoxynivalenol 24 h	No effect on expression of NLRP3 and procaspase-1 or LC3B-I to LC3B- II conversion	Ge <i>et al.</i> , 2020
	IPEC-J2 cells	co-exposure 4 µM deoxynivalenol and lipopolysaccharide 24 h	Higher expression of NLRP3 and procaspase-1 LC3B-I to LC3B-II conversion	
	HT-29	0.1 - 10 µM deoxynivalenol, 24h	Immunofluorescence expression of LC3	Del Favero <i>et al.</i> , 2018
HEP-G2 Cells	0,01 to 0,1 µg/mL deoxynivalenol, 24 h	Immunofluorescence expression of LC3	Beisl <i>et al.</i> , 2022	

Annexe II

Classifications des sous-types des toxines Stx et CDT

Shiga toxin (Stx)

Type	Sous-type	Sérotype/sérogroupe	<i>eae</i> / <i>aggR</i>	Pathologie induite	Récepteur	Références
Stx1	Stx 1a	O157:H7 O26:H11 O111:H8	<i>eae</i> ⁺ / <i>aggR</i> ⁻ <i>eae</i> ⁺ (β1)/ <i>aggR</i> ⁻ <i>eae</i> ⁺ (θ)/ <i>aggR</i> ⁻	SHU	Gb3, Gb4	Nakajima <i>et al.</i> , 2001, Blanco <i>et al.</i> , 2004; Madic <i>et al.</i> , 2011
	Stx 1c	O5:H (-) O128:H2 O145:NM	<i>eae</i> / <i>aggR</i> ^{+/-} <i>eae</i> ⁺ / <i>aggR</i> ⁻ <i>eae</i> ⁺ / <i>aggR</i> ⁻	Diarrhées	Gb3	Koch <i>et al.</i> , 2001, Blanco <i>et al.</i> , 2004; Brett <i>et al.</i> , 2003; Elder <i>et al.</i> , 2020
	Stx 1d	ONT:H19	<i>eae</i> ⁻ / <i>aggR</i> ⁻	Non	Gb3	Burk <i>et al.</i> , 2003, Blanco <i>et al.</i> , 2004
Stx2	Stx 2a	O157:H7 O26:H11 O104:H4 O111:H8 O80:H2 O2:H27	<i>eae</i> ⁺ / <i>aggR</i> ⁻ <i>eae</i> ⁺ (β1)/ <i>aggR</i> ⁻ <i>eae</i> ⁺ / <i>aggR</i> ⁺ <i>eae</i> ⁺ (θ)/ <i>aggR</i> ⁻ <i>eae</i> (ξ) ⁺ / <i>aggR</i> ⁻ <i>eae</i> ⁺ / <i>aggR</i> ⁻	SHU	Gb3, Gb4	Nakajima <i>et al.</i> , 2001, EFSA 2020, Soysal <i>et al.</i> , 2016; Madic <i>et al.</i> , 2011
	Stx 2b	O2:H21 Non-O157	<i>eae</i> ⁻ / <i>aggR</i> ⁻ <i>eae</i> / <i>aggR</i> ^{+/-}	Maladies bénines	Gb3	Pierard <i>et al.</i> , 1998; Mora <i>et al.</i> , 2012
	Stx 2c	O157:H(-) O80:H2	<i>eae</i> ⁻ / <i>aggR</i> ⁻ <i>eae</i> (ξ) ⁺ / <i>aggR</i> ⁺	SHU	Gb3	Schmidt <i>et al.</i> , 1996, EFSA 2020, Soysal <i>et al.</i> , 2016
	Stx 2d (act.)	O15:H27 O159:H16 O80:H2	? ? <i>eae</i> (ξ) ⁺ / <i>aggR</i> ⁻	SHU	Gb3	Bielaszewska <i>et al.</i> , 2010, Baranzoni <i>et al.</i> , 2016, EFSA 2020; Soysal <i>et al.</i> , 2016
	Stx 2e	O139:H1	?	Maladie de l'œdème du porc	Gb4	Baldo <i>et al.</i> , 2020, Tyler <i>et al.</i> , 1991
	Stx 2f	O80:H2 O26:H11 O55:H9	<i>eae</i> (ξ) ⁺ / <i>aggR</i> ⁻ <i>eae</i> ⁺ (β1)/ <i>aggR</i> ⁻ ?	SHU	Gb3?	Schmidt <i>et al.</i> , 2000, EFSA 2020, Soysal <i>et al.</i> , 2016
	Stx 2g	O103:H28 O2:H25	<i>eae</i> ⁻ / <i>aggR</i> ⁻ ?	Non	Gb3?	Leung <i>et al.</i> , 2003; Mora <i>et al.</i> , 2012
	Stx 2h	O170:H18	?	?	Gb3?	Gill <i>et al.</i> , 2022
	Stx 2o	O85:H1	?	?	Gb3?	Gill <i>et al.</i> , 2022
	Stx 2j	O158:H23 O33:H14	?	?	Gb3?	Gill <i>et al.</i> , 2022

Cytotolethal distending toxin (CDT)

Variant	Sérotype/sérogroupe	Pathologie induite	Référence
CDT-I	O86:H34	Diarrhées, inflammation, carcinogénèse	Scott, 1994, Blaskova <i>et al.</i> , 2010; He <i>et al.</i> , 2019
CDT-II	O128:NM	Diarrhées, inflammation	Pickett <i>et al.</i> , 1994
CDT-III	O15:H21		Pérès <i>et al.</i> , 1997
CDT-IV	O2, O6, O75, O170	?	Tóth <i>et al.</i> , 2003
CDT-V	O157:H7/NM (STEC)		Janka <i>et al.</i> , 2003

Annexe III : chapitre de livre

Mycotoxins : From Field to Feed

Hazard assessment of mycotoxins for farm and companion animals : a European perspective

Chloé Terciolo, **Marion Garofalo**, Delphine Payros, Bernadette Willoquet, Alix Pierron, Philippe Pinton, Isabelle P. Oswald

Toxalim (Research Centre in Food Toxicology, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-PURPAN, UPS, Toulouse, France.

Mycotoxins are secondary metabolites produced by filamentous fungal species. Several families of mycotoxins with more than 300 compounds are found in food and feed. Among the different food commodities contaminated, cereal grains are the major source of mycotoxins contamination. Because of their harmful effects and their common occurrence in feed, it is necessary to establish toxicological reference values for humans but also for the different farm and companion animal species exposed to these feed contaminants. At the European level, the establishment of these toxicological reference values is performed by the European Food Safety Agency (EFSA) and published in various scientific opinions.

The EFSA opinions collect and scrutinize scientific information available in the public domain, in our case on the toxicity of mycotoxins. Within the animal hazard assessment process, it includes data on toxicokinetics as well as data on *in vivo* and *in vitro* toxicity. The farm and companion animals covered are ruminants (including small ruminants), pigs, poultry (broiler chicken, laying hens, turkeys and ducks), farmed fish, horses, farmed rabbits, dogs and cats. Based on the assessed toxicity data health, toxicological reference values are determined. The no-observed- adverse-effect level (NOAEL) or the lowest-observed- adverse-effect level (LOAEL) are used as a reference point to characterize the chronic risks from the exposure to mycotoxins.

This chapter gives an overview of the toxicological values determined for several mycotoxins (trichothecenes, fumonisins, aflatoxins, zearalenone, ochratoxins, beauvericin, enniatins and ergot alkaloids) on farm and domestic animal species.

We especially summarize data obtained on ruminants (Table 1), poultry (Table 2), pig (Table 3), fish (Table 4) as well as horse, rabbit, cats and dog (Table 5).

Trichothecenes

Deoxynivalenol (DON) belongs to the type B trichothecenes. It occurs with both its acetylated (3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON) ; 15-ADON) and glucoside (deoxynivalenol-3-glucoside, DON- 3G) derivatives. These three forms are expected to have the same *in vivo* toxicity as 3-ADON and 15-ADON can be deacetylated and glucoside moiety of DON-3G cleaved in the intestinal tract. Therefore, a group toxicological reference value could be used for the sum of the three toxins (EFSA 2017a). The available toxicity data allowed identifying an acute reference dose in pig, farmed mink and dogs. Chronic adverse effects were identified in many farm and companion animal species, and NOAEL/LOAEL could be identified for ruminants (including small ruminants), pigs, poultry species, farmed fish, cats dogs, horses and farmed rabbits (Tables 1 to 5).

Nivalenol (NIV) also belongs to the type B trichothecenes. However, compared to DON, much less data are available concerning this toxin. No toxicity data have been identified for ruminants, rabbits, fish and companion animals but LOAEL were identified in pigs and poultry (Tables 2 and 3).

T-2 and HT-2 toxins are members of the type A trichothecenes, characterized by an esterified group or free hydroxyl group at carbon 8. T-2 toxin is rapidly metabolized to a large number of products, HT-2 toxin being a major metabolite. The toxicological reference value was thus derived for the sum of T2 and HT2 toxins (EFSA, 2011). Such reference values were identified for cattle, poultry, fish, rabbit and pig. This later species was among the most susceptible animals towards the effects of T-2 toxin, the most sensitive endpoints being immunological or hematological effects (Table 2)

Zearalenone (ZEN)

ZEN is a phenolic resorcylic acid lactone and exhibits oestrogen-like activity in farm animals by binding to the estrogen receptors. In pigs, sheep and turkeys, the endpoint used for HBGV was mainly linked to the oestrogenic activity of the molecule while others endpoints were used for broiler chickens and sheep (EFSA 2017b). Of note, many different modified forms of ZEN have been identified with very different oestrogenic activity when compared to ZEN.

To take that into account, relative potency factors were established based on *in vivo* uterotrophic assays performed in rodents ; they were used to established a group toxicological reference value for ZEN and its modified forms in different animal species (EFSA, 2016).

Fumonisin

Fumonisin are a large family of mycotoxins with structural similarities to sphingoid bases. Fumonisin B1 (FB1) is the most documented toxins of this family and FB2 and FB3 also present in feed. The limited data on FB2 and FB3 suggest a similar toxicity of the three toxins. The sum of FB1, FB2 and FB3 was used to determine the reference values for farm animal species (EFSA 2018). Various endpoints were used to established these toxicological reference values. The very high sensitivity of horses and the low sensitivity of cattle should be noted (Tables 1 and 5).

Ochratoxins

Ochratoxins are a family of mycotoxins produced by fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. Among the several members of this family, ochratoxin A (OTA) is the most toxic and it has been classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as “possibly carcinogenic to humans” (group 2B). This toxin is also a potent nephrotoxic compound. The data in farm and companion animals are scarce and only one LOAEL on pig has been identified (EFSA, 2004a ; Table 2).

Aflatoxins (AFs)

AFs are extremely potent carcinogens in all animal species, and most of the AFs members are classified as “carcinogenic to humans” by IARC (group 1). AFB1 is the most abundant form of AFBs and it targets the liver and increases the development of hepatic cancers. Whereas acute clinical intoxications are rarely seen under the conditions of modern agricultural practice, sub-optimal weight gain, lower milk and egg production, as well as an increased susceptibility towards infectious diseases may lead to considerable economic losses in animal production due to aflatoxin exposure. However, from the available data, NOAEL or LOAEL could not be defined for farm and companion animals (EFSA 2004b).

Ergot Alkaloids (EAs)

EAs are produced by species of *Claviceps* and are classified as indole alkaloids, derived from a tetracyclic ergoline ring system.

More than 50 different EAs have been identified so far. Their structural similarity with dopamine, noradrenaline and serotonin is involved in their toxicity and interrupts the neurotransmission. These alkaloids can also have negative effects on feed intake, growth and reproduction but different factors can influence these negative outcomes (EFSA, 2012). Toxicological reference values have been determined for both pigs and poultry (Tables 2 and 3).

Emerging mycotoxins

In addition to the above-mentioned toxins for which regulation and/or recommendation exists in animal feed, many other secondary metabolites are produced by fungi. New mycotoxins called "emerging mycotoxins" are not regulated, nor routinely detected. They have always existed and are now of growing interest. Among them, the most frequent are enniatins (ENNs), beauvericin (BEA) and produced by *Fusarium* species (EFSA, 2014).

BEA is a cyclic hexadepsipeptide, which transports mono or divalent cations across the membranes and disrupts the cellular homeostasis.

ENNs are cyclic hexadepsipeptides. Among 29 species of ENNs known, ENNs A, A1, B and B1 are the most frequently detected in food and feed. Their toxicity is based on their ionophoric properties but they also show cytotoxic effects, particularly severe toxicity towards mitochondria.

For those emerging toxins, due to the paucity of data, toxicological reference values could only be established for poultry, based on zootechnical parameters (Table 3).

In conclusion, mycotoxins are natural contaminants that are very often present in animal feed. This review illustrates the scarcity of toxicological data which are however necessary to determine toxicological reference values for farm and companion animal species. Indeed, with the exception of DON, it was not possible to define toxicological reference values for all the different animal species notably ruminants (including small ruminants), pigs, poultry species, horses, farmed rabbits, farmed fish, cats and dogs. When characterizing risk from mycotoxin exposure, the identified NOAELs/LOAELs are compared to the dietary exposure estimates. For animals, since the reference points are obtained for the species considered, no safety factors are added during the risk assessment process. However, it should be noted that within an animal species, many factors might influence the susceptibility such as age, weight... For fish, most of the toxicological data are obtained in carp and extrapolated to all fish species.

Mycotoxins often co-occur and it is important to take the mixtures into consideration. So far, group reference values are determined for toxins within the same family (example DON and ZEN) but the co-exposure of mycotoxins from different families still need to be addressed (Grenier and Oswald, 2011 ; Alassane-Kpembi *et al.*, 2017).

References

- Alassane-Kpembi I, Schatzmayr G, Marin D, Taranu I, Puel O, Oswald IP 2017. Mycotoxins co-contamination : Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 16 : 3489.
- EFSA (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). 2004a. Ochratoxin A as undesirable substance in animal feed. EFSA Journal 4 : 365.
- EFSA (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). 2004b. Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. EFSA Journal 2 : 39.
- EFSA (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). 2011. Presence of T-2 and HT-2 toxins in food and feed. EFSA Journal 9 : 2481.
- EFSA (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). 2012. Ergot alkaloids in food and feed. EFSA Journal 10 : 2798.
- EFSA (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). 2013. Risks for animal and public health related to the presence of nivalenol in food and feed. EFSA Journal 11 : 3262.
- EFSA (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). 2014. Risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. EFSA Journal 12 : 3802.
- EFSA (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). 2016. Appropriateness to set a group health-based guidance value for zearalenone and its modified forms. EFSA Journal 14 : 4425.
- EFSA (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). Knutsen HK, Alexander J, Barregard L, Bignami M, Bruschweiler B, Ceccatelli S, Cottrill B, Dinovi M, Grasl-Kraupp B, Hogstrand C, Hoogenboom LR, Nebbia CS, Oswald IP, Petersen A, Rose M, Roudot AC, Schwerdtle T, Vleminckx C, Vollmer G, Wallace H, De Saeger S, Eriksen GS, Farmer P, Fremy JM, Gong YY, Meyer K, Naegeli H, Parent-Massin D, Rietjens I, van Egmond H, Altieri A, Eskola M, Gergelova P, Ramos Bordajandi L, Benkova B, Dorr B, Gkrillas A, Gustavsson N, van Manen M, Edler L, 2017a. Risks to human and animal health related to

the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. EFSA Journal 15 : 4718.

- EFSA (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), Knutsen HK, Alexander J, Barregard L, Bignami M, Bruschweiler B, Ceccatelli S, Cottrill B, Dinovi M, Edler L, Grasl-Kraupp B, Hogstrand C, Hoogenboom LR, Nebbia CS, Petersen A, Rose M, Roudot AC, Schwerdtle T, Vleminckx C, Vollmer G, Wallace H, Dall’Asta C, Danicke S, Eriksen GS, Altieri A, Roldan-Torres R, Oswald IP. 2017b. Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. EFSA Journal 15 : 4851.
- EFSA (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), Knutsen HK, Alexander J, Barregard L, Bignami M, Bruschweiler B, Ceccatelli S, Cottrill B, Dinovi M, Edler L, Grasl-Kraupp B, Hogstrand C, Hoogenboom LR, Nebbia CS, Petersen A, Rose M, Roudot AC, Schwerdtle T, Vleminckx C, Vollmer G, Wallace H, Dall’Asta C, Eriksen GS, Taranu I, Altieri A, Roldan-Torres R, Oswald IP, 2018. Risks for animal health related to the presence of fumonisins, their modified forms and hidden forms in feed. EFSA Journal 16 : 5242
- Grenier B, Oswald IP 2011. Mycotoxin co-contamination of foods and feeds : meta-analysis of publications describing toxicological interactions. World Mycotoxin Journal 4 :285.

Table 1 : Toxicological references values determined by EFSA for ruminants exposed to selected mycotoxins.

Mycotoxin	Ruminant	NOAEL mg/kg feed <i>µg/kg b.w.</i>	LOAEL mg/kg feed <i>µg/kg b.w.</i>	Endpoint	Reference
DON	dairy cow	5 mg/kg feed		reduced feed intake ; reduced body weight gain ; weight gain	EFSA, 2017a
	heifer	10 mg/kg feed			
	beef cattle, steers	18 mg/kg feed			
	sheep	16 mg/kg feed			
	goat	5 mg/kg feed			
T2-HT2	calves		300 <i>µg/kg b.w.</i>	Gastrointestinal lesions ; alteration of serum proteins and hematology	EFSA, 2011
ZEN	sheep	1.5 mg kg feed 28 <i>µg/kg b.w.</i>		Alteration of ovulation rates and lambing percentages	EFSA, 2017b

FBs	cattle	31 mg/kg feed <i>600 µg/kg</i> <i>b.w.</i>		Increase in serum enzymes, cholesterol and bilirubin ; decrease in lymphocyte blastogenesis	EFSA 2018
------------	--------	--	--	--	--------------

note : no toxicological reference value was determined for ruminants exposed to NIV, OTA, AFB1, EAs, BEA, ENNB and ENNB1

Table 2 : Toxicological references values determined by EFSA for pigs exposed to selected

Mycotoxin	NOAEL mg/kg feed <i>µg/kg b.w.</i>	LOAEL mg/kg feed <i>µg/kg b.w.</i>	Endpoint	Reference
DON	0.7 mg/kg feed		Reduced feed intake ; reduced body weight gain ; weight gain	EFSA, 2017a
NIV		2.5 mg/kg feed 100 <i>µg/kg b.w.</i>	Hematological alteration ; reduced proliferation of lymphocytes from blood, spleen or thymus	EFSA, 2013
T2-HT2		0.5 mg/kg feed 29 <i>µg/kg b.w.</i>	Immunological or hematological effects	EFSA, 2011
ZEN	0.22 mg/kg feed 10.4 <i>µg/kg b.w.</i>		Estrogenic effects	EFSA, 2017b
FBs	1 mg/kg feed 40 <i>µg/kg b.w.</i>		Effect on performances	EFSA, 2018
OTA		8 mg/kg feed 200 <i>µg/kg b.w.</i>	Alteration of renal structure	EFSA, 2004b
EAs	3.57 mg/kg feed 150 <i>µg/kg b.w.</i>		Alteration of growth performance ; modification of serum biochemical parameters	EFSA, 2012

mycotoxins

note : no toxicological reference value was determined for pigs exposed to AFB1, BEA, ENNB and ENNB1

Table 3 : Toxicological references values determined by EFSA for poultry exposed to selected mycotoxins.

Mycotoxin	Poultry	NOAEL mg/kg feed <i>µg/kg b.w.</i>	LOAEL mg/kg feed <i>µg/kg b.w.</i>	Endpoint	Reference
DON	broiler chickens	5 mg/kg feed		Body weight gain ; feed conversion ratio ; modifications of intestine morphology	EFSA, 2017a
	laying hens	5 mg/kg feed		Zootechnical parameters (feed intake, egg fertility)	
	duck	7 mg/kg feed		Zootechnical parameters	
	turkey	7 mg/kg feed		Zootechnical parameters	
NIV	broiler chickens		3 mg/kg feed <i>360 µg/kg bw.</i>	Alteration of the gizzard	EFSA, 2013
	laying hens		1 mg/kg feed <i>53 µg/kg bw.</i>	Histological alteration of the kidney	
T2-HT2	broiler chickens		0.5 mg/kg feed <i>40 µg/kg bw.</i>	Mucosal oral damage	EFSA, 2011
	laying hens		2 mg/kg feed <i>120 µg/kg bw.</i>	Infertility, reduced egg production	
	duck		0.2 mg/kg feed <i>40 µg/kg bw.</i>	Reduced body weight gain	
	turkey		0.5 mg/kg feed <i>48 µg/kg bw.</i>	Mucosal oral damage	
ZEN	broiler chickens	50 mg/kg feed <i>7500 µg/kg b.w.</i>		Reduced lymphocyte counts	EFSA, 2017b
	turkey	100 mg/kg feed <i>9100 µg/kg b.w.</i>		Vent swelling	
FBs	Chickens	20 mg/kg feed <i>2600 µg/kg b.w.</i>		Decreased liver lipids	EFSA, 2018
	duck	8 mg/kg feed <i>400 µg/kg b.w.</i>		Alterations of liver enzymes	
	turkey	20 mg/kg feed <i>670 µg/kg b.w.</i>		Feed consumption ; increased Sa/So ratios in liver and kidney	
EAs	broiler chickens	1.4 mg/kg feed		Inflammations in the proximal duodenum	EFSA, 2012

ENNB	broiler chickens	12.72 mg/kg feed 763 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.		Live weights and feed intake	EFSA, 2014
	laying hens	11.23 mg/kg feed 674 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.			
ENNB1	broiler chickens	4.06 mg/kg feed 244 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.		Live weights and feed intake	EFSA, 2014
	laying hens	3.6 mg/kg feed 216 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.			
BEA	broiler chickens	12.6 mg/kg feed 1220 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.		Live weights and feed intake	EFSA, 2014
	laying hens	8.93 mg/kg feed 536 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.			
	turkey	2.48 mg/kg feed 136 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.			

note : no toxicological reference value was determined for poultry exposed to OTA and AFB1

Table 4 : Toxicological references values determined by EFSA for fish exposed to selected mycotoxins.

Mycotoxin	NOAEL mg/kg feed <i>µg/kg b.w.</i>	LOAEL mg/kg feed <i>µg/kg b.w.</i>	Endpoint	Reference
DON	60 mg/kg feed		Reduced feed intake, body weight gain ; lipid peroxidation ; histopathological changes	EFSA, 2017a
T2-HT2	0.63 mg/kg feed <i>13 µg/kg b.w.</i>		Reduced feed intake and growth ; alteration of hematocrit	EFSA, 2011
ZEN	0.3 mg/kg feed <i>9 µg/kg b.w.</i>		Alteration of blood formula ; lipid peroxidation	EFSA, 2017b
FBs		10 mg/kg feed <i>0.5 µg/kg b.w.</i>	Reduced weight gain ; neuronal apoptosis in brain	EFSA, 2018

note : no toxicological reference value was determined for fish exposed to NIV, OTA, AFB1, EAs, BEA, ENNB and ENNB1

Table 5 : Toxicological references values determined by EFSA for rabbit, cat, dog and horse exposed to selected mycotoxins

Mycotoxin	Species	NOAEL mg/kg feed <i>µg/kg b.w.</i>	LOAEL mg/kg feed <i>µg/kg b.w.</i>	Endpoint	Reference
DON	rabbit	4 mg/kg feed		Reduced feed intake and body weight ; alteration of the relative organ weights	EFSA, 2017a
	cat	6 mg/kg feed		Reduced body weight gain	
	dog	4 mg/kg feed		Reduced body weight gain	
	horse	36 mg/kg feed		Reduced feed intake	
T2-HT2	rabbit	<i>100 µg/kg b.w.</i>		Alteration of drug metabolizing enzymes ; microsomal oxidative damages	EFSA, 2011
FBs	rabbit		130 <i>µg/kg</i> feed	Decreased performance ; alteration of plasma markers and blood formula ; congestion of liver and kidney ; impaired spermatogenesis, delayed puberty ; increased Sa/So ratio	EFSA, 2018
	horses	200 <i>µg/kg</i> feed		Neurological effects	
ZEN	dog		1.7 mg/kg feed <i>25 µg/kg b.w.</i>	Degenerative lesions of myometrium and endometrium ; enlargement and atrophy of uterine glands ; changes in blood formula ; alteration of biochemical parameters	EFSA, 2017b

note : this table combined all the toxicological reference values determined by EFSA for DON, NIV, T2-HT2, ZEN, FBs, OTA, AFB1, EAs, BEA, ENNB and ENNB1, for the 4 animals species considered.

Résumé

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques synthétisés par certains champignons microscopiques qui contaminent les denrées alimentaires. Le déoxynivalénol (DON) est l'une des mycotoxines les plus répandues dans l'alimentation à base des céréales. L'intoxication au DON provoque des vomissements, ou encore des altérations du système immunitaire. Au niveau cellulaire, le DON cible et inhibe les ribosomes eucaryotes. Récemment, un nouvel effet du DON a été découvert dans l'équipe: cette ribotoxine, qui n'est pas génotoxique, augmente les dommages à l'ADN induits par une génotoxine bactérienne, la colibactine. L'Homme est exposé à de nombreuses ribotoxines et génotoxines qui proviennent de sources variées et exercent leur toxicité au travers de différents modes d'actions. Dans ce travail, nous avons démontré que plusieurs ribotoxines de diverses origines augmentent la génotoxicité de multiples génotoxines alimentaires, médicamenteuses, ou bactériennes. En effet, le DON, mais aussi plusieurs autres mycotoxines de la même famille, augmentent la génotoxicité induite par des drogues médicamenteuses, des génotoxines bactériennes, ou encore un pesticide. De plus, la Shiga toxine, une ribotoxine bactérienne au mode d'action différent du DON, augmente également la génotoxicité d'une drogue médicamenteuse. De manière intéressante, cette interaction entre ribotoxines et génotoxines existe également entre toxines produites par une même bactérie, et pourrait ainsi exercer un effet potentialisateur dans la virulence bactérienne. La mise en lumière de ces effets « cocktail » permet d'alerter sur l'importance d'étudier les mélanges de toxines plutôt que les toxines séparément. De plus, l'accumulation de dommages à l'ADN étant une cause majeure de cancers, ce travail de thèse suggère un rôle du DON et plus généralement des ribotoxines dans la carcinogénèse.

Abstract

Mycotoxins are toxic secondary metabolites synthesized by microscopic fungi that contaminate foodstuffs. Deoxynivalenol (DON) is one of the most common mycotoxins found in cereal-based foods. DON poisoning causes vomiting and alterations of the immune system. At the cellular level, DON targets and inhibits eukaryotic ribosomes. Recently, a novel effect of DON was discovered in the team: this ribotoxin, which is not genotoxic, increases the DNA damage induced by the bacterial genotoxin colibactin. Humans are exposed to many ribotoxins and genotoxins from various sources, which exert their toxicity through different modes of action. In this work, we have demonstrated that several ribotoxins of various origins increase the genotoxicity of multiple food, drug, or bacterial genotoxins. Indeed, DON, but also several other mycotoxins of the same family, increase the genotoxicity induced by drug, bacterial genotoxins, or a pesticide. In addition, Shiga toxin, a bacterial ribotoxin with a different mode of action than DON, also increases the genotoxicity of a drug. Interestingly, this interaction between ribotoxins and genotoxins also exists between toxins produced by the same bacterium and could thus exert a potentiating effect in bacterial virulence. The highlighting of these « cocktail » effects alerts to the importance of studying mixtures of toxins rather than individual toxins. Moreover, since the accumulation of DNA damage is a major cause of cancer, this work suggests a role for DON and more generally for ribotoxins in carcinogenesis.