

Université de Lille
Ecole Doctorale Biologie Santé (n°446)

Thèse de Doctorat

Biochimie, biologie cellulaire et moléculaire, physiologie et nutrition

Soutenue le
24 novembre 2023

Madjid DJOUINA

Unité de recherche INFINITE (U1286)

**Impact toxicologique de contaminants
alimentaires au niveau intestinal et
hépatique**

Composition du jury

| | |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| Pr. Jean LESAGE | <i>Président du jury</i> |
| Dr. Muriel MERCIER-BONIN | <i>Rapportrice</i> |
| Pr. Stéphane MORTAUD | <i>Rapporteur</i> |
| Pr. Guillaume BOUGUEN | <i>Examineur</i> |
| Dr. Mathilde BODY-MALAPEL | <i>Directrice de thèse</i> |
| Dr. Cécile VIGNAL | <i>Co-encadrante de thèse</i> |

Résumé et mots clés

Cette thèse examine les effets toxicologiques de contaminants alimentaires au niveau intestinal et hépatique sur des modèles murins.

Dans le premier chapitre, une revue de la littérature détaille l'organisation et les fonctions du système digestif, en mettant particulièrement l'accent sur l'intestin et le foie, ainsi que sur certaines pathologies associées. Cette exploration s'accompagne d'une description de l'omniprésence des contaminants dans notre alimentation et de leur impact sur notre santé.

Dans un deuxième chapitre, l'attention est portée sur la mycotoxine déoxynivalénol, un contaminant fréquent des produits céréaliers, et son impact sur l'inflammation intestinale et le cancer colorectal. Les résultats montrent que le déoxynivalénol aggrave l'entérite induite par l'indométacine et favorise le développement du cancer colorectal associé à la colite. De plus, des altérations du microbiote intestinal et du métabolisme bactérien sont observées.

Le troisième chapitre se concentre sur les effets des microplastiques de polyéthylène, qui représentent l'un des contaminants alimentaires émergents de ces dernières années. Les résultats indiquent que ces microplastiques altèrent la composition du microbiote intestinal ainsi que les réponses inflammatoires de l'intestin. Au niveau hépatique, les microplastiques exacerbent les processus inflammatoires et fibrotiques, notamment dans le contexte de la fibrose hépatique induite par le tétrachlorure de carbone.

En résumé, cette thèse met en évidence les effets néfastes de certains contaminants alimentaires sur l'intestin et le foie. Ces résultats soulignent l'importance de prévenir et de gérer les risques associés aux contaminants alimentaires afin de préserver la santé gastro-intestinale et hépatique chez l'Homme.

Mots clés : contaminants alimentaires, intestin, foie, déoxynivalénol, microplastique, microbiote.

Abstract and keywords

This thesis examines the toxicological effects of dietary contaminants on the intestinal and hepatic levels using murine models.

In the first chapter, a literature review details the organization and functions of the digestive system, with a particular focus on the intestine and the liver, as well as certain associated pathologies. This exploration is accompanied by a description of the omnipresence of contaminants in our diet and their impact on our health.

In the second chapter, attention is focused on the mycotoxin deoxynivalenol, a common contaminant in cereal products, and its impact on intestinal inflammation and colorectal cancer. The results demonstrate that deoxynivalenol exacerbates indomethacin-induced enteritis and promotes the development of colorectal cancer associated with colitis. Additionally, alterations in the intestinal microbiota and bacterial metabolism are observed.

The third chapter centers on the effects of polyethylene microplastics, which represent one of the emerging dietary contaminants in recent years. The results indicate that these microplastics alter the composition of the intestinal microbiota as well as the inflammatory responses in the intestine. At the hepatic level, microplastics exacerbate inflammatory and fibrotic processes, particularly in the context of carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis.

In summary, this thesis highlights the adverse effects of certain dietary contaminants on the intestine and the liver. These findings emphasize the importance of preventing and managing the risks associated with dietary contaminants to preserve gastrointestinal and hepatic health in humans.

Keywords : food contaminants, intestine, liver, deoxynivalenol, microplastics, microbiota.

Remerciements

Je tiens à dédier ces pages de remerciements à toutes les personnes qui ont joué un rôle clé dans la réalisation de ma thèse et dans mon parcours professionnel. Leur précieux soutien, leurs encouragements et leur expertise ont été d'une importance capitale pour moi.

Au Pr. **Jean Lesage** merci d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je vous suis reconnaissant pour votre implication lors de la soutenance et pour votre soutien.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude envers les rapporteurs de ma thèse, le Dr. **Muriel Mercier-Bonin** et le Pr. **Stéphane Mortaud**. Merci à vous d'avoir accepté cette mission et d'avoir pris le temps d'évaluer mon travail.

Au Pr. **Guillaume Bouguen**, merci à toi d'avoir accepté sans hésitation de faire partie des membres de mon jury. Triste que tu ne puisses pas être en présentiel mais honoré que tu puisses évaluer mon travail.

À **Mathilde & Cécile** ;

Il y a 17 ans (déjà !), j'arrivais dans le laboratoire pour contribuer à mettre en place avec vous la nouvelle équipe "environnement", que l'on a très vite rebaptisée "l'équipe Dream". À cette époque, nous ne savions pas si cela signifiait "équipe de rêve" ou "équipe qui rêve" ! Aujourd'hui, au vu de tout ce que nous avons accompli, on peut dire que nous formons une véritable Dream team ! Un grand merci à vous deux pour toutes ces années passées à vos côtés, qui m'ont grandement fait évoluer, et cette évolution, j'espère la mettre à profit dans notre équipe pour les années à venir. Merci de m'avoir fait confiance et soutenu dans cette aventure doctorale.

Je n'oublie pas les membres de mon comité de suivi individuel, le Dr. **Guillaume Duflos** et le Dr. **Benoit Chassing**. J'ai été très honoré d'avoir pu vous rencontrer et d'avoir pu échanger avec vous, merci d'avoir pris le temps de me conseiller et de me soutenir.

Cette thèse est aussi le fruit de nombreuses collaborations et échanges au sein de notre unité et même au-delà. Chaque interaction, chaque discussion, a contribué de manière significative à l'enrichissement de ce travail.

À toi, **Laurent**, qui as su te rendre disponible pour écouter mon projet professionnel. Merci pour tes encouragements et pour ton soutien, que ce soit pour mon parcours doctoral mais

aussi au fil de toutes ces années qui ont nécessité ton implication dans les méandres des procédures administratives pour mon évolution de carrière.

À **Caro & Silvia** ;

Mes coéquipières et amies depuis le début (moins quelques années pour toi Silvia). Merci à vous deux pour votre présence, vos conseils, votre soutien et votre humour ! Caro, je pense qu'un jour il faudra dire à Silvia qu'on ne comprend toujours rien quand elle parle et que oui, toutes les catastrophes naturelles sont bien dues à sa présence...

À **Christophe**, je t'assure que j'ai une phobie administrative qui m'empêche de faire les commandes... Un grand merci à toi pour tout ce que tu fais au quotidien ! Notre Dream team s'est renforcée à ton arrivée.

Un grand merci à toutes les personnes, passées et présentes, qui animent notre quotidien et contribuent à créer les conditions optimales pour que nous puissions travailler dans les meilleures conditions : A **Audrey, Nicolas & Anthony**, le labo sans vous n'est plus le même ! A **Matthias, Marie, Arnaud, Bertrand, Francesco, Momo, Fatima, Maxime, Solène, Rodolphe, Ségo, Cyril, Noémie, Yamina, Alexis, Solange, Thomas** et **Manel**.

Une spéciale dédicace à notre toute jeune retraitée, **Bernadette**, merci pour tout ce que t'as pu faire pour moi et pour l'ensemble de l'unité.

À toute l'équipe de bactério qui compte beaucoup pour moi, à commencer par **Christel Neut** qui m'a tant appris et transmis cette passion pour la recherche et le monde des bactéries, j'aurais tellement aimé que tu sois encore là pour partager ce moment. Que serait le labo de bactério sans **Isabelle** et **Séverine**, merci à vous deux pour tous les bons moments. À ceux qui m'ont permis de mettre un pied dans l'enseignement, merci **Benoit** de m'avoir fait confiance pour assurer des TP et pour animer avec toi un atelier sur l'éthique en recherche. À **Elisabeth** et **Marie-Françoise**, votre passion pour l'enseignement m'a contaminé ! Merci d'avoir pris le temps de me former, merci pour votre soutien et votre gentillesse.

Au Pr. **Boualem Sendid** et son équipe, pour leur encouragement, leur conseil et leur aide. A **Rogatien, Clovis** et bien sûr **Karine**, l'experte de la glyco !

Aux personnels des plateformes :

En animalerie : À **Franck**, je t'assure que je faisais des coloscopies aux souris et rien d'autre... Merci à toi de prendre soin de nos animaux, merci d'être aussi dévoué pour ton travail et merci pour ta gentillesse et ton humour ! Merci aussi à **Martin, Arnold** et **Audrey**.

En imagerie : À vous les microscopistes, **Meryem, Antonino, Marie-Hélène** et **Sarah**, merci pour votre aide et vos conseils.

En cytométrie : Merci à vous, **Nathalie** et **Emilie**, d'être toujours présentes, notamment pour m'aider à mettre en route le spectral et à me rappeler (à chaque fois) son fonctionnement...

Enfin, je ne peux terminer ces pages de remerciements sans citer mes plus grands soutiens, **Yasmine, Yakine** et **Hania**.

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Résumé et mots clés | 1 |
| Abstract and keywords | 2 |
| Remerciements | 3 |
| Table des matières | 6 |
| Liste des abréviations..... | 9 |
| Liste des figures..... | 11 |
| Introduction générale | 14 |
| Chapitre 1 : Introduction bibliographique..... | 18 |
| 1. Exploration fondamentale de l'intestin : Aperçu de ses caractéristiques principales..... | 19 |
| 1.1. Organisation anatomique des intestins | 19 |
| 1.2. Organisation histologique de la paroi intestinale..... | 21 |
| 1.3. Fonctions physiologiques principales de l'intestin | 23 |
| 1.4. Barrière et immunité de la muqueuse intestinale : Gardiens de l'homéostasie | 24 |
| 1.5. Microbiote intestinal : Composition et implications | 26 |
| 1.6. Exemples de pathologies de l'intestin | 28 |
| 1.6.1. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin | 28 |
| 1.6.2. Le cancer colorectal | 30 |
| 2. Exploration fondamentale du foie : Aperçu de ses caractéristiques principales | 33 |
| 2.1. Organisation anatomique du foie | 33 |
| 2.2. Organisation histologique du foie..... | 33 |
| 2.3. Fonctions physiologiques principales du foie | 35 |
| 2.4. Principales pathologies du foie | 37 |
| 3. Toxicologie alimentaire : Exploration des contaminants chimiques de nos denrées alimentaires | 39 |
| 3.1. Les sources des contaminants alimentaires | 40 |
| 3.2. Cas des mycotoxines | 42 |
| 3.2.1. Le déoxynivalénol..... | 43 |
| 3.2.2. Occurrence du DON au niveau mondial | 43 |
| 3.2.3. Exposition humaine au DON et réglementation Européenne..... | 44 |
| 3.2.4. Métabolisme et toxicité du DON | 46 |
| 3.3. Cas des microplastiques..... | 52 |
| 3.3.1. Définition de microplastique | 52 |
| 3.3.2. Les principaux polymères et leur utilisation | 54 |
| 3.3.3. Origines de contamination alimentaire et incidence sur l'exposition humaine..... | 56 |

| | |
|--|------------|
| 3.3.4. Etudes toxicologiques <i>in vivo</i> | 61 |
| 3.3.4.1. Toxicité au niveau intestinale | 62 |
| 3.3.4.2. Toxicité au niveau hépatique..... | 64 |
| 3.3.5. Quelques études sur modèles <i>in vitro</i> humains. | 66 |
| 3.3.5.1. Sur cellules épithéliales | 67 |
| 3.3.5.2. Sur cellules immunitaires..... | 68 |
| 3.3.5.3. Sur le microbiote intestinal..... | 69 |
| Objectifs de la thèse | 72 |
| Chapitre 2 : Une contamination alimentaire à faible dose par la mycotoxine déoxynivalérol exacerbe l'entérite et le cancer colorectal chez la souris. | 75 |
| 1. Résumé de l'article 1..... | 76 |
| 2. Article 1 | 77 |
| 3. Conclusion de l'article 1 | 95 |
| Chapitre 3 : Impact toxicologique des microplastiques de polyéthylène au niveau intestinal et hépatique. | 96 |
| 1. Partie 1 : L'exposition orale aux microplastiques de polyéthylène modifie la morphologie intestinale, la réponse immunitaire et la composition du microbiote chez la souris. | 97 |
| 1.1. Résumé de l'article 2 | 97 |
| 1.2. Article 2..... | 99 |
| 1.3. Conclusion de l'article 2..... | 110 |
| 2. Partie 2 : L'exposition orale aux microplastiques de polyéthylène induit des changements inflammatoires et métaboliques et favorise la fibrose dans le foie des souris..... | 111 |
| 2.1. Résumé de l'article 3 | 111 |
| 2.2. Article 3..... | 112 |
| 2.3. Conclusion de l'article 3..... | 124 |
| Discussion & perspectives générales | 125 |
| 1. Analyse et discussion de l'impact du déoxynivalérol sur l'intestin en condition pathologique | 127 |
| 2. Analyse et discussion de l'impact des microplastiques de polyéthylène sur l'intestin et le foie | 131 |
| 3. Limites et perspectives de nos études..... | 138 |
| 3.1. Dans le cas du déoxynivalérol | 139 |
| 3.1.1. Prise en compte des effets cocktail..... | 139 |
| 3.1.2. Approfondir la pertinence chez l'Homme | 140 |
| 3.2. Dans le cas des microplastiques | 141 |
| 3.2.1. Prise en compte des différents polymères et de leur capacité à véhiculer des xénobiotiques..... | 141 |
| 3.2.2. Étayer la pertinence chez l'Homme | 143 |
| 3.2.3. De l'exposition précoce aux impacts à l'âge adulte : perspectives à considérer ... | 144 |

| | |
|---|------------|
| 3.2.4. Impact au-delà de la sphère digestive : exploration de l'axe intestin-microbiote-cerveau | 145 |
| 4. Microplastiques et mycotoxines : Parallèles dans leurs impacts sur la santé, rôle vecteur et co-exposition alimentaire | 146 |
| Conclusion générale | 148 |
| Annexes..... | 151 |
| Références bibliographiques..... | 164 |

Liste des abréviations

| | |
|---|---|
| ABCB1 : <i>ATP binding cassette subfamily B member 1</i> | HMGB1 : <i>high mobility group box 1</i> |
| Acaca : <i>Acetyl-CoA Carboxylase Alpha</i> | HMOX1 : <i>Heme Oxygenase 1</i> |
| ADN : <i>acide désoxyribonucléique</i> | HSC : <i>cellules étoilées hépatiques</i> |
| AGE : <i>Advanced Glycation End products</i> | IGF-1 : <i>insulin-like growth factor 1</i> |
| ALD : <i>affections de longue durée</i> | IL-1 β : <i>interleukine-1β</i> |
| ALT : <i>alanine aminotransferase</i> | IL23R : <i>récepteur de l'interleukine-23</i> |
| AP-1 : <i>Activator protein 1</i> | IL-6 : <i>interleukine-6</i> |
| AST : <i>aspartate aminotransferase</i> | IL-8 : <i>interleukine 8</i> |
| ATG16L1 : <i>autophagy related 16 like 1</i> | IMC : <i>indice de masse corporelle</i> |
| Bcl-2 : <i>B-cell lymphoma 2</i> | IRF-5 : <i>Interferon regulatory factor 5</i> |
| CAT : <i>catalase</i> | JECFA : <i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i> |
| CCl4 : <i>tétrachlorure de carbone</i> | JNK : <i>Jun N-terminal Kinase</i> |
| CCR : <i>cancer colorectal</i> | Lgr5 : <i>Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5</i> |
| CDKs : <i>Cyclin-dependent kinases</i> | LPS : <i>lipopolysaccharide</i> |
| CESE : <i>Conseil économique, social et environnemental</i> | MAPK : <i>Mitogen-activated protein kinases</i> |
| CHC : <i>carcinome hépatocellulaire</i> | M-ARCOL : <i>Mucosal Artificial Colon</i> |
| CIRC : <i>Centre International de Recherche sur le Cancer</i> | MIC1 : <i>maladies inflammatoires chroniques de l'intestin</i> |
| CMC : <i>carboxyméthylcellulose</i> | MP : <i>maladie de Parkinson</i> |
| CMR : <i>cancérogène, mutagène et reprotoxique</i> | MRP Voir Multidrug Resistance Protein |
| Col1a1 : <i>collagen type I alpha 1 chain</i> | Muc2 : <i>Mucin2</i> |
| COX2 : <i>cyclooxygénase 2</i> | NAFLD : <i>Non-Alcoholic Fatty Liver Disease</i> |
| CYP : <i>cytochrome P450</i> | NASH : <i>Non-Alcoholic Steatohepatitis</i> |
| Dgat1 : <i>Diacylglycerol O-Acyltransferase 1</i> | Nfe2l2 : <i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i> |
| Dgat2 : <i>Diacylglycerol O-Acyltransferase 2</i> | NF- κ B : <i>nuclear factor-kappa B</i> |
| DJT : <i>dose journalière tolérable</i> | NK : <i>natural killer</i> |
| DOHaD : <i>origines développementales de la santé et des maladies</i> | NLR : <i>récepteurs de type NOD-like</i> |
| DOM-1 : <i>dé-époxy-DON</i> | NOAEL : <i>non observed adverse effect level</i> |
| DON : <i>déoxynivalénol</i> | NOD2 : <i>nucleotide-binding oligomerization domain 2</i> |
| DSS : <i>dextran sulfate de sodium</i> | NOS2 : <i>Nitric Oxide Synthase 2</i> |
| EFSA : <i>European Food Safety Authority</i> | Nqo1 : <i>NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1</i> |
| ERK : <i>Extracellular signal-regulated kinases</i> | OATPs : <i>polypeptides transporteurs d'anions organiques</i> |
| F11r : <i>F11 Receptor</i> | OATs : <i>transporteurs d'anions organiques</i> |
| Fasn : <i>Fatty Acid Synthase</i> | OCT Voir transporteur de cation organique |
| GB : <i>green bead</i> | OCTs : <i>transporteurs de cations organiques</i> |
| Gpat : <i>Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase 3</i> | OMS : <i>Organisation mondiale de la santé</i> |
| GPX1 : <i>Glutathione Peroxidase 1</i> | PC : <i>Polycarbonate</i> |
| GSH : <i>glutathion</i> | PCNA : <i>Proliferating Cell Nuclear protein</i> |
| GST Voir Glutathion S-transférase | Pdgra : <i>Platelet Derived Growth Factor Subunit A</i> |
| HAP : <i>hydrocarbures aromatiques polycycliques</i> | PE : <i>Polyéthylène</i> |

| | |
|--|---|
| PET : Polyéthylène téréphtalate | <i>protein 1c</i> |
| P-GP : P-glycoprotéine | TG : triglycérides |
| PP : Polypropylène | TGF- β 1 : Transforming Growth Factor Beta 1 |
| PPAR γ : Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma | Th17 : lymphocytes T auxiliaires de type 17 |
| PS : Polystyrène | TLR : récepteurs de type Toll |
| PU : Polyuréthane | TLR4 : Toll Like Receptor 4 |
| PVC Polychlorure de vinyle | Tm-ARCOL : Toddler mucosal Artificial Colon |
| RB : red bead | TNF- α : Tumor Necrosis Factor α |
| ROS : espèces réactives de l'oxygène | TNM : Tumor Node Metastasis |
| Scd1 : stearyl-CoA desaturase 1 | Tregs : lymphocytes T régulateurs |
| SCF : Scientific Committee on Food | TSA : trouble du spectre de l'autisme |
| SIMGI : SIMulator Gastro-Intestinal | UDP-glucuronosyltransférase : UDP-glucuronosyltransférase |
| SIRT3 : sirtuine 3 | UGT : UDP-glucuronyltransférases |
| SLC26A3 : solute carrier family 26 member 3 | UV : ultra-violet |
| SOD : superoxyde dismutase | ZO-1 : Zonula occludens-1 |
| Srebp1c : sterol regulatory element binding | α -SMA : Alpha smooth muscle actin |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Organisation cellulaire de la muqueuse grêlique. Adaptée de Antfolk & Jensen, 2020..... | 22 |
| Figure 2 : Organisation structurale du mucus de l'intestin grêle et du colon | 25 |
| Figure 3 : Organisation cellulaire du foie. Adaptée de Fanti et al., 2017 | 34 |
| Figure 4 : Schéma général de la métabolisation des xénobiotiques (Le Goff, 2020) | 36 |
| Figure 5 : Carte mondiale de la prévalence et des risques en mycotoxines dans différentes régions (DSM World Mycotoxine Survey 2021). | 44 |
| Figure 6 : Métabolisme du DON et de ses formes acétylées et modifiées chez les humains et les animaux. (Payros et al., 2016) | 48 |
| Figure 7 : Répartition de la demande des transformateurs de plastiques européens par application et par type de polymère. | 56 |
| Figure 8 : Évolution du nombre de publications scientifiques référencées dans PubMed sur les microplastiques (juillet 2023)..... | 61 |
| Article 1 - Figure 1 : Effect of 8-day deoxynivalenol exposure on colon and small intestine histomorphology and proliferating cell nuclear antigen. | 80 |
| Article 1 - Figure 2 : Effect of 8-day deoxynivalenol exposure on indomethacin-induced enteritis. | 81 |
| Article 1 - Figure 3 : Effects of chronic exposure to deoxynivalenol in the development of colitis in the azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced model of colorectal cancer. . | 81 |
| Article 1 - Figure 4 : Endoscopic assessment of protumorigenic effects of deoxynivalenol exposure in colorectal cancer. | 82 |
| Article 1 - Figure 5 : Macroscopic and histological assessments of the protumorigenic effects of deoxynivalenol exposure on colorectal cancer. | 82 |
| Article 1 - Figure 6 : Effects of deoxynivalenol exposure on cecal content microbiome of mice with colorectal cancer..... | 83 |
| Article 1 - Figure 7 : Effects of deoxynivalenol exposure on microbiota fucose and rhamnose metabolism in mice with colorectal cancer..... | 84 |
| Article 1 - Figure 8 : Heatmap of Spearman's rank correlation between the abundance of the changed gut microbiota and colon inflammation, tumorigenesis and ERK signaling variables measured in mice with colorectal cancer unexposed or exposed to deoxynivalenol. | 85 |

| | |
|--|-----|
| Article 1 - Figure Supp. 1 : Quantification of the effects of deoxynivalenol on ERK signalling pathway genes in the azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced model of colorectal cancer. | 90 |
| Article 1 - Figure Supp. 2 : Differential abundance of significantly changed bacterial orders analyzed with Corncob in mice with colorectal cancer. | 91 |
| Article 1 - Figure Supp. 3 : Differential abundance of significantly changed bacterial families analyzed with Corncob in mice with colorectal cancer. | 92 |
| Article 1 - Figure Supp. 4 : Differential abundance of significantly changed bacterial genera analyzed with Corncob in mice with colorectal cancer. | 93 |
| Article 1 - Figure Supp. 5 : Predicted Metacyc pathways in mice with colorectal cancer unexposed or exposed to deoxynivalenol. | 94 |
| | |
| Article 2 - Figure 1 : Characterization of polyethylene microbeads. | 102 |
| Article 2 - Figure 2 : Effects of polyethylene exposure on proximal small intestine epithelium histomorphology and immune response. | 104 |
| Article 2 - Figure 3 : Effects of polyethylene exposure on distal small intestine epithelium histomorphology and immune response. | 105 |
| Article 2 - Figure 4 : Effects of polyethylene exposure on colon epithelium histomorphology and immune response. | 106 |
| Article 2 - Figure 5 : Effects of polyethylene exposure on the gut microbiome. | 107 |
| | |
| Article 3 - Figure 1 : Effects of polyethylene exposure on liver lipid metabolism. | 114 |
| Article 3 - Figure 2 : Effects of polyethylene exposure on liver xenobiotic metabolism and oxidative stress markers. | 115 |
| Article 3 - Figure 3 : Effects of polyethylene exposure on liver injury. | 116 |
| Article 3 - Figure 4 : Effects of polyethylene exposure on liver cell proliferation and apoptosis. | 117 |
| Article 3 - Figure 5 : Effects of polyethylene exposure on markers of main liver cell types. | 117 |
| Article 3 - Figure 6 : Effects of polyethylene exposure on liver HSC activation. | 118 |

Article 3 - Figure 7 : Effects of polyethylene exposure on susceptibility to liver fibrosis. .118

Article 3 - Figure Supp. 1 : Effects of polyethylene exposure on mice123

Introduction générale

Au cours des cinq dernières décennies, il a été constaté une augmentation continue du nombre de personnes souffrant de maladies chroniques telles que l'obésité, le diabète, le cancer et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Entre 2011 et 2017, les admissions pour les affections de longue durée (ALD) en France ont enregistré une croissance annuelle moyenne de 5,1 %. Selon le Conseil économique, social et environnemental (CESE), cette tendance devrait se maintenir voire s'accroître dans les années à venir (Chassang & Gautier, 2019).

En plus des facteurs génétiques, il est bien établi sur le plan scientifique qu'il existe des liens entre la pollution environnementale et la prévalence des maladies chroniques. Cette pollution peut prendre différentes formes et contaminer l'organisme humain par le biais de diverses voies d'exposition. Parmi celles-ci, les polluants atmosphériques tels que les particules présentes dans l'air ou les gaz d'échappement sont largement soupçonnés de jouer un rôle dans l'émergence des affections respiratoires (Annesi-Maesano et al., 2021). De plus, les contaminants alimentaires sont également soupçonnés de contribuer à l'apparition et à l'aggravation des troubles digestifs (Grados et al., 2022). C'est sur ce dernier facteur environnemental que mes travaux de thèse se sont concentrés.

Les contaminants alimentaires font référence à des substances chimiques qui se retrouvent dans les aliments destinés à la consommation humaine sans y être intentionnellement ajoutées. Ces substances peuvent être présentes à différentes étapes de la production, de la transformation ou du transport des aliments. Il existe principalement deux sources majeures de contamination alimentaire (Coumoul, 2016). La première source est d'origine naturelle et est souvent liée à la présence de micro-organismes, tels que les moisissures qui produisent des mycotoxines sur des denrées alimentaires comme les céréales ou les fruits secs (Rapport de l'AFSSA, 2019). La deuxième source de contamination est liée à l'activité humaine, où les aliments peuvent être contaminés à différentes étapes de leur cycle de vie. On peut identifier trois moments où ils sont particulièrement exposés à une contamination d'origine humaine : 1) lors de leur production, par l'utilisation de produits phytosanitaires et de pesticides pour les protéger contre les organismes nuisibles, 2) lors de certains processus industriels, notamment la cuisson à haute température qui peut favoriser la formation de substances cancérigènes telles que l'acrylamide, 3) lors de leur conservation, en raison de l'utilisation de contenants qui peuvent libérer des composés toxiques tels que l'aluminium (Vignal et al., 2016) ou les microplastiques (Hirt & Body-Malapel, 2020).

Le système digestif est la cible principale des contaminants alimentaires, en particulier les intestins et le foie. Les intestins se composent de deux parties distinctes, l'intestin grêle et le colon (ou gros intestin), qui ont des fonctions spécifiques. L'intestin grêle, divisé en trois parties (duodénum, jéjunum et iléon), joue un rôle essentiel dans la digestion des aliments, transformant les nutriments en substances absorbables par les cellules de la paroi intestinale. Le gros intestin est responsable de l'absorption de l'eau, des ions et des vitamines, ainsi que du compactage et du stockage des déchets avant leur élimination.

Les intestins, en parfaite symbiose avec l'organisme, abritent un microbiote composé de plus de 10^{12} micro-organismes, tels que des bactéries, des virus, des parasites et des champignons non pathogènes. Cette flore intestinale remplit de nombreuses fonctions qui contribuent au maintien de l'homéostasie de l'organisme.

En ce qui concerne le foie, il joue un rôle essentiel dans le processus de digestion des aliments en produisant la bile, qui facilite la digestion des lipides. Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes notamment intéressés à la fonction de détoxification des xénobiotiques du foie. En effet, le foie possède une variété d'enzymes capables de dégrader ou de modifier les substances toxiques en produits non toxiques pour l'organisme, qui seront ensuite éliminés dans les selles ou les urines.

Les intestins et le foie sont constamment exposés à un environnement qui les met à rude épreuve, les obligeant à s'adapter en permanence pour maintenir un équilibre interne optimal. Dans le cadre de cette thèse, notre objectif est de démontrer que certains contaminants alimentaires ont la capacité de perturber cet équilibre physiologique, ce qui peut entraîner l'apparition de diverses pathologies digestives. De plus, nous nous intéressons à la susceptibilité de certaines affections digestives à l'égard de la présence de contaminants dans l'alimentation.

Dans une première étude, nous examinerons l'impact d'un contaminant alimentaire naturel dans le contexte de pathologies intestinales sur deux modèles murins. Le premier modèle portera sur l'entérite, tandis que le deuxième modèle se concentrera sur le développement de la tumorigenèse dans un modèle de cancer colorectal associé à la colite. Pour cette étude, nous avons choisi de nous concentrer sur la mycotoxine la plus répandue dans le monde : le déoxynivalénol. ***Les résultats de cette partie ont été publiés dans le journal "Science of the Total Environment" en juillet 2023.***

Dans une deuxième étude, nous explorerons les effets d'un contaminant d'origine humaine. Nous nous intéresserons tout d'abord à son impact sur l'homéostasie intestinale, puis nous étudierons les déséquilibres qu'il induit au niveau hépatique, tant dans un contexte sain que pathologique, en utilisant un modèle murin. Cette partie se focalisera sur les matières plastiques, plus précisément sur les microplastiques de polyéthylène, qui suscitent une préoccupation croissante en raison de leur utilisation répandue dans les emballages et de leur accumulation dans divers compartiments de l'environnement, y compris dans notre alimentation. ***Les résultats de l'effet des microplastiques de polyéthylène au niveau intestinal ont été publiés en septembre 2022 dans le journal "Environmental Research", et ceux portant sur les effets au niveau hépatique ont été publiés en septembre 2023 dans le journal « Ecotoxicology and Environmental Safety ».***

Chapitre 1 : Introduction bibliographique

1. Exploration fondamentale de l'intestin : Aperçu de ses caractéristiques principales

1.1. Organisation anatomique des intestins

L'intestin chez l'Homme est un organe essentiel du système digestif, responsable de la digestion des aliments et de l'absorption des nutriments. Il se compose de deux parties distinctes : l'intestin grêle et le gros intestin, également appelé côlon.

L'intestin grêle, est une partie majeure du tractus gastro-intestinal humain. Mesurant environ 6 à 7 mètres de long, il est divisé en trois segments anatomiques distincts : le duodénum, le jéjunum et l'iléon (Campbell et al., 2019).

Le duodénum, d'une longueur d'environ 25 centimètres, est la première partie de l'intestin grêle et joue un rôle crucial dans la digestion. Il est responsable de la réception des aliments partiellement digérés provenant de l'estomac, ainsi que des sucs digestifs sécrétés par le pancréas et la vésicule biliaire. Ces sucs digestifs contiennent des enzymes essentielles à la dégradation des macromolécules alimentaires en nutriments plus petits.

Le jéjunum, d'une longueur d'environ 2,5 mètres, est la partie médiane de l'intestin grêle. Sa paroi présente une structure caractérisée par des villosités intestinales, qui sont de petites projections en forme de doigts. Ces villosités augmentent considérablement la surface d'absorption disponible, permettant ainsi l'absorption efficace des nutriments issus de la digestion. Le jéjunum est particulièrement impliqué dans l'absorption des glucides, des protéines et des graisses, jouant ainsi un rôle clé dans la nutrition.

L'iléon, d'une longueur d'environ 3,5 mètres, constitue la dernière partie de l'intestin grêle, se connectant au côlon, également connu sous le nom de gros intestin. L'iléon présente une structure similaire au jéjunum, avec des villosités intestinales permettant une absorption accrue des nutriments. Cette section de l'intestin grêle est principalement impliquée dans l'absorption des vitamines liposolubles, des sels biliaires et des produits finaux de la digestion.

La paroi de l'intestin grêle est composée de plusieurs couches, notamment une muqueuse qui abrite les villosités intestinales. Ces structures augmentent la surface d'absorption, facilitant ainsi l'absorption des nutriments dans la circulation sanguine. Les entérocytes, des cellules spécialisées présentes sur la paroi intestinale, jouent un rôle essentiel dans l'absorption des nutriments et la régulation de l'homéostasie intestinale.

Le gros intestin, également connu sous le nom de côlon, est la dernière partie du tube digestif chez l'Homme. Il s'étend du côlon ascendant, situé du côté droit de l'abdomen, jusqu'au côlon sigmoïde, qui se connecte au rectum. Le gros intestin est caractérisé par une structure en forme de tube, avec une paroi musculaire épaisse et plissée. Sa fonction digestive principale est l'absorption de l'eau, des électrolytes et des vitamines, ainsi que la formation et le stockage des matières fécales.

Anatomiquement, le gros intestin est divisé en plusieurs parties distinctes. Le côlon ascendant remonte du côté droit de l'abdomen vers le côlon transverse, qui traverse l'abdomen d'un côté à l'autre. Le côlon descendant descend du côté gauche de l'abdomen, tandis que le côlon sigmoïde est une section en forme de "S" située près du rectum. Cette structure en segments permet au gros intestin d'accomplir différentes fonctions à chaque étape.

La paroi du gros intestin est constituée de plusieurs couches, comprenant une couche muqueuse, une couche sous-muqueuse, une couche musculaire et une couche séreuse. La couche muqueuse contient des glandes qui sécrètent du mucus, facilitant le mouvement des matières fécales. La couche musculaire, composée de muscles circulaires et longitudinaux, assure la propulsion des matières fécales à travers le côlon.

Le rectum et l'anus sont des parties essentielles du système digestif chez l'Homme, situées à la fin du gros intestin. Le rectum est la portion du tube digestif qui se trouve entre le côlon sigmoïde et l'anus, tandis que l'anus est l'orifice par lequel les matières fécales sont éliminées du corps. Ces structures jouent un rôle crucial dans le contrôle de l'élimination des déchets et dans la régulation des selles.

Le rectum est une partie musculaire extensible du tube digestif, conçue pour stocker temporairement les matières fécales avant leur évacuation. Il est composé de trois couches principales : la couche muqueuse, la couche sous-muqueuse et la couche musculaire. La couche muqueuse est tapissée de cellules glandulaires qui sécrètent du mucus, facilitant le passage des selles. La couche musculaire du rectum est responsable de la contraction et de la relaxation nécessaire pour expulser les selles lors de la défécation.

L'anus, quant à lui, est l'ouverture finale du système digestif. Il est composé de deux sphincters musculaires : le sphincter interne et le sphincter externe. Le sphincter interne est un muscle lisse involontaire qui est continuellement contracté pour maintenir la continence

des matières fécales. Le sphincter externe est un muscle strié volontaire qui peut être contrôlé consciemment pour permettre la défécation.

La fonction principale du rectum et de l'anus est de permettre l'élimination des matières fécales du corps. Lorsque les selles s'accumulent dans le rectum, des signaux sont envoyés au cerveau pour déclencher le besoin d'aller à la selle. Lors de la défécation, les muscles du rectum se contractent et les sphincters s'ouvrent pour permettre aux selles de passer à travers l'anus et d'être évacuées.

1.2. Organisation histologique de la paroi intestinale

La structure histologique de l'intestin est complexe et composée de différentes couches cellulaires qui contribuent à ses fonctions spécifiques. Voici une description des principaux types cellulaires présents au niveau de la muqueuse intestinale :

Cellules épithéliales : Les cellules épithéliales tapissent la surface interne de l'intestin et sont responsables de l'absorption des nutriments. Elles sont étroitement liées et forment des jonctions serrées, créant une barrière imperméable pour réguler le passage des substances à travers l'intestin. Ces cellules sont dotées de microvillosités, de petites projections en forme de doigt, qui augmentent la surface d'absorption.

Cellules caliciformes : Les cellules caliciformes, ou cellules à mucus, sont des cellules glandulaires présentes dans la muqueuse intestinale. Elles produisent et sécrètent du mucus, qui lubrifie la paroi intestinale, facilitant ainsi le mouvement des matières fécales et protégeant les cellules épithéliales des irritants et des infections.

Cellules entéroendocrines : Les cellules entéroendocrines sont dispersées dans la muqueuse intestinale et produisent des hormones et des peptides qui jouent un rôle dans la régulation de divers processus digestifs. Par exemple, les cellules entéroendocrines produisent de la sérotonine, de la gastrine et de la cholécystokinine, qui influencent la motilité intestinale, la sécrétion des enzymes digestives et la sensation de satiété.

Cellules de Paneth : Les cellules de Paneth sont principalement situées dans la partie inférieure des glandes intestinales. Elles produisent et sécrètent des peptides antimicrobiens, tels que le lysozyme et les défensines, qui aident à maintenir l'équilibre du microbiote intestinal en empêchant la prolifération excessive de certaines bactéries pathogènes.

Cellules souches : Les cellules souches intestinales sont situées dans le fond des cryptes. Elles jouent un rôle crucial dans le renouvellement constant de la muqueuse intestinale, qui est nécessaire pour maintenir la fonction digestive et la barrière protectrice de l'intestin. Les cellules souches intestinales ont la capacité de se diviser et de se différencier en divers types de cellules spécialisées qui composent l'épithélium, telles que les cellules caliciformes et les cellules de Paneth.

Cellules immunitaires : L'intestin abrite un grand nombre de cellules immunitaires qui jouent un rôle crucial dans la protection contre les infections et le maintien de l'homéostasie. Parmi ces cellules, on trouve les lymphocytes, les macrophages et les cellules dendritiques, qui participent à la réponse immunitaire adaptative et innée en surveillant les agents pathogènes et en activant les mécanismes de défense appropriés.

Cellules musculaires : Les cellules musculaires lisses sont présentes dans la paroi de l'intestin et sont responsables de la contraction et de la relaxation des muscles intestinaux, permettant ainsi le mouvement des matières fécales à travers le tractus intestinal. Les contractions coordonnées de ces cellules musculaires facilitent la digestion et la propulsion des aliments le long de l'intestin.

La structure histologique de l'intestin, avec ses différentes couches cellulaires spécialisées, assure les fonctions essentielles de digestion, d'absorption des nutriments, de protection contre les infections et de régulation de la motilité intestinale (figure 1). Cette organisation complexe contribue au bon fonctionnement de l'intestin.

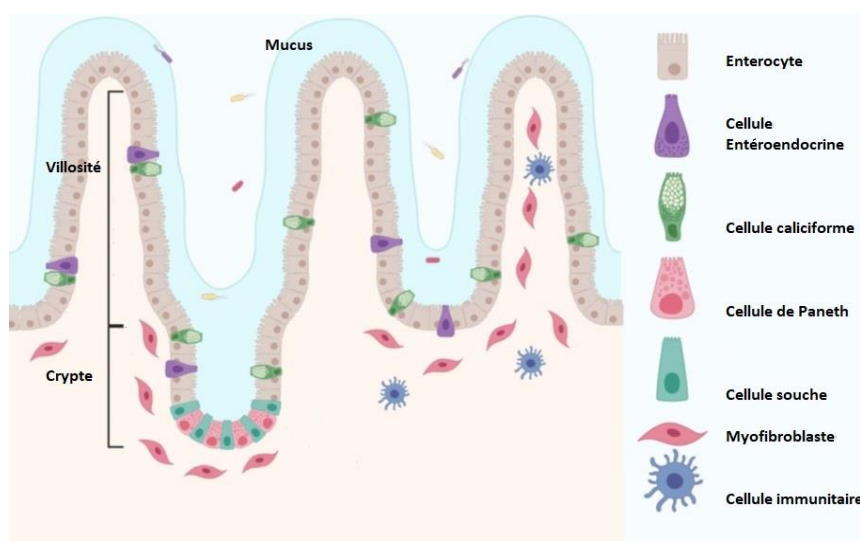


Figure 1 : Organisation cellulaire de la muqueuse grêlique. Adaptée de Antfolk & Jensen, 2020

1.3. Fonctions physiologiques principales de l'intestin

Le système digestif assure plusieurs fonctions physiologiques essentielles au bon fonctionnement de l'organisme dans son ensemble. Voici un aperçu des principales fonctions de l'intestin :

Digestion : L'intestin joue un rôle crucial dans la digestion des aliments. Les enzymes digestives, produites par les glandes présentes dans la paroi intestinale, aident à décomposer les nutriments en molécules plus petites, telles que les glucides, les lipides et les protéines, qui peuvent être absorbées par l'organisme.

Absorption des nutriments : L'intestin grêle, en particulier, est responsable de l'absorption des nutriments essentiels provenant des aliments digérés. Les villosités intestinales, de petites structures en forme de doigts présentes dans la paroi intestinale, augmentent la surface d'absorption, permettant aux nutriments, tels que les vitamines, les minéraux et les acides aminés, d'être absorbés dans le système circulatoire pour être utilisés par le corps.

Absorption de l'eau et des électrolytes : Le gros intestin, en particulier, est responsable de l'absorption de l'eau et des électrolytes, tels que le sodium et le potassium. Cette fonction contribue à maintenir l'équilibre hydrique de l'organisme et à prévenir la déshydratation.

Formation et élimination des matières fécales : Le gros intestin est chargé de la formation et du stockage des matières fécales avant leur élimination du corps. Les résidus non digérés, tels que les fibres alimentaires, les cellules mortes et les bactéries, se transforment en matières fécales à mesure qu'ils traversent le côlon. Lorsque les selles s'accumulent dans le rectum, elles sont évacuées par le processus de défécation.

Barrière protectrice et immunité : La paroi intestinale agit comme une barrière protectrice entre l'intérieur de l'intestin et le reste du corps. Elle empêche la pénétration de substances potentiellement nocives dans la circulation sanguine. De plus, les cellules immunitaires présentes dans la paroi intestinale, telles que les lymphocytes intraépithéliaux, contribuent à la réponse immunitaire et à la défense contre les infections.

Interaction avec le microbiote intestinal : L'intestin abrite une communauté complexe de microorganismes bénéfiques, connue sous le nom de microbiote intestinal. Le microbiote intestinal interagit avec l'intestin, favorisant la digestion des fibres alimentaires, la synthèse de certaines vitamines et le maintien de l'équilibre de la flore intestinale. Il joue également un rôle clé dans le développement et le fonctionnement du système immunitaire.

1.4. Barrière et immunité de la muqueuse intestinale : Gardiens de l'homéostasie

La barrière intestinale, une structure complexe et vitale, joue un rôle fondamental dans le maintien de l'équilibre entre la perméabilité sélective nécessaire à l'absorption des nutriments et la prévention de l'entrée de substances potentiellement nocives dans le système circulatoire. Constituée d'une monocouche d'épithélium intestinal, cette barrière est renforcée par des jonctions serrées, des glycoprotéines de mucus et des cellules immunitaires spécialisées. Ensemble, ces éléments agissent en synergie pour créer un environnement sélectif et protecteur, tout en permettant le transport actif des nutriments essentiels.

Le mucus intestinal, produit par les cellules caliciformes, constitue un élément crucial de la barrière protectrice qui enveloppe la muqueuse intestinale. En formant un gel visqueux qui recouvre la surface épithéliale, le mucus établit une interface vitale entre l'épithélium intestinal et le contenu luminal. Il remplit plusieurs fonctions essentielles pour la préservation de la santé intestinale. En premier lieu, il agit comme une barrière physique, empêchant tout contact direct entre les bactéries et les cellules épithéliales, réduisant ainsi les risques d'invasion microbienne. De plus, le mucus renferme des protéines antimicrobiennes, notamment des défensines et du lysozyme, ainsi que des immunoglobulines, en particulier des IgA (Immunoglobuline A), qui contribuent à neutraliser les agents pathogènes et à moduler la composition du microbiote intestinal.

La composition du mucus varie selon son emplacement dans le tractus intestinal, mais elle est principalement constituée de la mucine MUC2, une glycoprotéine caractérisée par sa structure moléculaire, comprenant une protéine centrale autour de laquelle s'enroulent de longues chaînes de glucides appelées O-glycanes. Les O-glycanes sont des chaînes de glucides linéaires ou ramifiées composées de monosaccharides tels que le glucose, le galactose, le mannose, le fucose, le N-acétylgalactosamine (GalNac), le N-acétylglucosamine (GlcNac), ou encore l'acide N-acétylneuraminique (acide sialique). Leur structure varie en fonction du type de monosaccharides, de leur nombre, de leur arrangement et de leur complexité (Luis & Hansson, 2023).

Du point de vue de la structure (figure 2), le mucus grêlique se caractérise par une seule couche relativement lâche et perméable aux micro-organismes. En revanche, le côlon présente une double couche : l'une interne, inerte et en contact avec les cellules épithéliales, et l'autre externe, exposée à la lumière colique, avec des interactions importantes avec les

bactéries. Certaines bactéries dites « mucophiles » favorisent spécifiquement la transition d'une structure dense du réseau de mucines vers un réseau plus lâche, permettant ainsi aux bactéries d'accéder à une niche écologique riche en substrats essentiels à leur prolifération (Gillois et al., 2018).

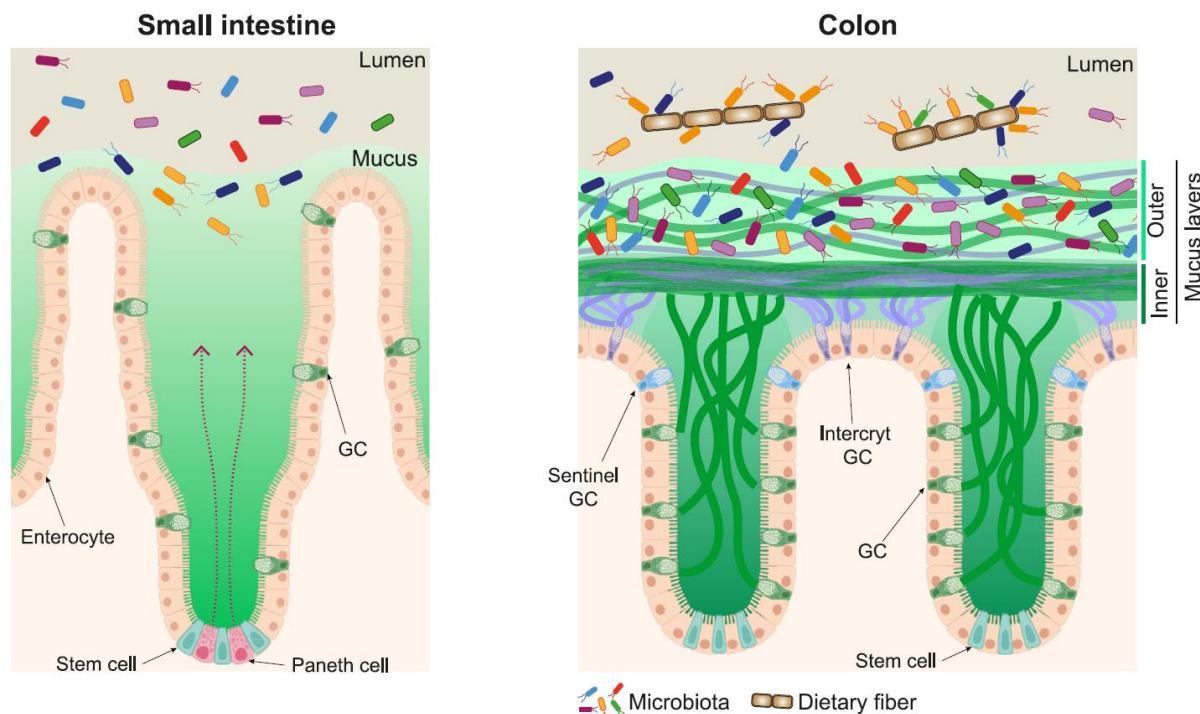


Figure 2 : Organisation structurale du mucus de l'intestin grêle et du colon
(Luis & Hansson, 2023)

En parallèle, les entérocytes occupent une position centrale dans la réponse immunitaire, jouant un rôle tant dans l'immunité innée que dans l'adaptative. Leur contribution découle de leur capacité à exprimer des récepteurs reconnaissant les motifs de surface des micro-organismes, tels que les récepteurs de type Toll (TLR) et les récepteurs de type NOD-like (NLR). De plus, les entérocytes participent activement à la synthèse de cytokines, de chimiokines et de peptides antibactériens. En tant que première ligne de défense de l'organisme, ils favorisent des réponses immunitaires appropriées, qu'elles soient de tolérance ou de défense, contribuant ainsi à l'équilibre intestinal (Mowat & Agace, 2014).

L'immunité intestinale ne se limite pas aux cellules épithéliales, mais inclut également d'autres composantes, telles que les cellules immunitaires, les tissus lymphoïdes et les molécules de signalisation. Parmi les cellules immunitaires clés participant à la défense intestinale, on retrouve les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes T et B, ainsi que les cellules immunitaires innées comme les cellules Natural Killer (NK) (Mowat & Agace, 2014).

Les tissus lymphoïdes intestinaux, comme les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques, abritent des lymphocytes T et B spécifiquement adaptés à la reconnaissance des antigènes intestinaux. Les cellules dendritiques intestinales captent les antigènes provenant de la lumière intestinale et les présentent aux lymphocytes T et B, facilitant ainsi la réponse immunitaire (Mörbe et al., 2021).

L'interaction étroite entre les cellules immunitaires et les bactéries commensales du microbiote intestinal est un élément crucial de l'immunité intestinale. Les bactéries commensales contribuent à moduler la réponse immunitaire en maintenant l'équilibre entre tolérance et réponse inflammatoire. En cas d'invasion par des pathogènes, l'immunité intestinale s'active, entraînant une réponse inflammatoire coordonnée visant à éliminer la menace (D. Zheng et al., 2020).

1.5. Microbiote intestinal : Composition et implications

Le microbiote intestinal, également connu sous le nom de flore intestinale, représente une communauté complexe de microorganismes qui peuplent l'intestin. Principalement composé de bactéries mais englobant également des virus, des champignons et d'autres microorganismes, le microbiote joue un rôle essentiel dans le maintien de la santé et du bon fonctionnement de l'organisme. Ses fonctions réunissent la dégradation des fibres alimentaires non digestibles, la synthèse de certaines vitamines (comme la vitamine K), le métabolisme de composés chimiques, et la régulation du système immunitaire (Thursby & Juge, 2017).

L'avancement de la métagénomique a grandement facilité notre compréhension approfondie du microbiote intestinal. Cette approche analytique permet l'étude du matériel génétique collectif des microorganismes présents dans un échantillon donné. La métagénomique nous procure des informations non seulement sur la composition générale du microbiote, mais aussi sur les gènes fonctionnels qui s'y trouvent.

Une des principales approches en métagénomique pour l'étude du microbiote est l'analyse de la diversité bactérienne, connue sous le nom de bêta diversité. Cette analyse permet la comparaison de la similitude ou la divergence entre les échantillons en fonction de leur composition bactérienne. Elle se sert de mesures statistiques comme l'indice de Jaccard, l'indice de Bray-Curtis, ou l'analyse en composantes principales.

L'interprétation des données obtenues par la bêta diversité met en lumière les variations dans la structure et la composition du microbiote entre individus, groupes de population ou

états de santé spécifiques. Ces différences peuvent être explorées en relation avec divers facteurs tels que l'âge, le régime alimentaire, l'indice de masse corporelle (IMC) ou des conditions médicales. L'analyse de la bêta diversité peut également révéler des schémas de regroupement, indiquant des sous-groupes distincts au sein de la population étudiée.

À l'échelle bactérienne, on retrouve six grands phyla abritant les principales familles bactériennes :

Firmicutes : Abondant dans le microbiote, ce phylum est associé à la dégradation des fibres alimentaires et à la production d'acides gras à chaîne courte.

Bacteroidetes : Présent également en grande quantité, ce phylum joue un rôle dans la décomposition des polysaccharides complexes et produit des métabolites bénéfiques.

Actinobacteria : Comme le *Bifidobacterium*, il est crucial pour la digestion des fibres et la synthèse de vitamines.

Proteobacteria : Incluant divers groupes, certains sont liés aux inflammations intestinales.

Verrucomicrobia : Mettant en avant les bactéries protégeant la muqueuse intestinale comme *Akkermansia muciniphila*.

Fusobacteria : Même en petite quantité, il peut avoir diverses fonctions intestinales.

Parmi les bactéries intestinales bénéfiques, les bifidobactéries et les lactobacilles produisent des métabolites utiles, comme les acides gras à chaîne courte, fournissant de l'énergie aux cellules intestinales. De plus, le microbiote a la capacité de maintenir son propre équilibre en inhibant la prolifération des bactéries pathogènes grâce à la production de substances antimicrobiennes.

Cependant, un déséquilibre du microbiote, appelé dysbiose, est associé à diverses maladies, y compris les troubles gastro-intestinaux, l'obésité, le diabète de type 2 et les maladies métaboliques (Afzaal et al., 2022).

1.6. Exemples de pathologies de l'intestin

1.6.1. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont des affections inflammatoires chroniques qui affectent la paroi de l'intestin. Les deux principaux types de MICI sont la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. La maladie de Crohn peut toucher n'importe quelle partie du tractus gastro-intestinal, tandis que la rectocolite hémorragique se limite généralement au côlon et au rectum (Silvio & Claudio, 2011). Les MICI sont caractérisées par une inflammation persistante et récurrente de la muqueuse intestinale, qui entraîne des symptômes tels que des douleurs abdominales, des diarrhées, des saignements rectaux et une perte de poids.

L'inflammation observée dans les MICI est le résultat d'une dysrégulation du système immunitaire intestinal. Les cellules immunitaires, y compris les lymphocytes, les macrophages et les cellules dendritiques, infiltrées dans la muqueuse intestinale, libèrent des cytokines et des médiateurs inflammatoires qui amplifient la réponse immunitaire et provoquent des lésions tissulaires (Neurath, 2019). L'interaction complexe entre les facteurs génétiques, environnementaux et immunologiques est impliquée dans la survenue et la progression des MICI.

Prévalence : On estime qu'environ 250 000 à 300 000 personnes en France sont atteintes de MICI, avec une légère prédominance chez les femmes.

Incidence : Le taux d'incidence annuel des nouveaux cas de MICI est d'environ 10 à 15 pour 100 000 personnes en France. Cela signifie qu'environ 6 000 nouveaux cas de MICI sont diagnostiqués chaque année.

Répartition géographique : Les MICI sont réparties de manière inégale sur le territoire français, avec une plus forte incidence dans certaines régions, telles que l'Île-de-France, le Nord-Pas-de-Calais, l'Alsace et la Bretagne.

Des études ont identifié des variations génétiques associées à un risque accru de développer une MICI. Par exemple, des mutations dans les gènes nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2), récepteur de l'interleukine-23 (IL23R) et autophagy related 16 like 1 (ATG16L1) ont été associées à un risque accru de maladie de Crohn (Garza-Hernandez et al., 2022). Cependant, il est important de noter que la génétique seule

ne suffit pas à expliquer l'apparition des MICI, car elles sont considérées comme des maladies polygéniques multifactorielles.

Les facteurs environnementaux jouent également un rôle clé dans le développement des MICI. Des études suggèrent que l'exposition à des agents pathogènes, des changements dans le régime alimentaire, le tabagisme, le stress psychologique et d'autres facteurs environnementaux peuvent influencer la susceptibilité aux MICI. Par exemple, le tabagisme est un facteur de risque bien établi pour la maladie de Crohn, mais il semble avoir un effet protecteur contre la rectocolite hémorragique. De plus, des changements dans le régime alimentaire, tels que la consommation d'aliments riches en graisses saturées et en sucres, ont été associés à une augmentation du risque de développer des MICI (Carreras-Torres et al., 2020).

Certaines études ont suggéré que certains contaminants alimentaires pourraient être impliqués dans le développement ou l'aggravation des MICI. Parmi ces contaminants, on retrouve notamment les additifs alimentaires, les résidus de pesticides et les métaux lourds.

Les additifs alimentaires, tels que les émulsifiants, les colorants artificiels et les édulcorants artificiels, sont couramment utilisés dans l'industrie alimentaire pour améliorer la texture, la couleur, la saveur et la durée de conservation des aliments transformés. Cependant, certaines études ont montré que ces additifs peuvent perturber l'équilibre de la flore intestinale et déclencher une inflammation intestinale chez des modèles animaux. Une étude publiée dans la revue "Nature" a révélé que l'exposition à l'émulsifiant carboxyméthylcellulose (CMC) induisait des changements dans la composition du microbiote intestinal et favorisait le développement de colites chez des souris (Chassaing et al., 2015). De plus, cette même équipe a montré que la consommation de CMC perturbe la composition du microbiote intestinal chez l'Homme en réduisant sa diversité et provoque des changements dans le métabolome fécal. Ces résultats suggèrent que l'utilisation de CMC dans les aliments transformés peut contribuer à l'augmentation des maladies inflammatoires chroniques (Chassaing et al., 2022).

Les résidus de pesticides sont également suspectés d'être associés aux MICI. Les pesticides sont utilisés pour protéger les cultures contre les parasites, les insectes et les mauvaises herbes, mais certains résidus peuvent persister dans les aliments que nous consommons. Des études ont révélé que l'exposition à certains pesticides, tels que le glyphosate, peut altérer la diversité et la fonction du microbiote intestinal, ce qui pourrait contribuer à l'inflammation intestinale (Leino et al., 2021). Une étude a établi une corrélation

entre l'utilisation du glyphosate sur les cultures de maïs et de soja et les diagnostics de maladies inflammatoires de l'intestin aux États-Unis (Swanson et al., 2014).

De plus, les métaux lourds tels que le plomb, le cadmium et l'aluminium sont présents comme contaminants dans certains aliments, notamment les poissons et les fruits de mer. Ces métaux peuvent s'accumuler dans l'organisme et causer des dommages cellulaires ainsi qu'une inflammation. Dans notre étude publiée en 2022, nous avons mis en évidence une susceptibilité accrue à l'aluminium chez les patients atteints de MICI, et cette susceptibilité pourrait être associée à des polymorphismes génétiques affectant l'expression des transporteurs ATP binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1) et Solute carrier family 26 member 3 (SLC26A3). Ces résultats soulignent la complexité de l'interaction gène/environnement dans les effets néfastes de l'aluminium sur la santé, en particulier chez les populations à risque ou les sous-types de patients (Djouina et al., 2022).

Une caractéristique courante des MICI est la dysbiose intestinale, qui se réfère à un déséquilibre de la composition et de la fonction du microbiote intestinal. Des études ont révélé des altérations spécifiques du microbiote chez les patients atteints de MICI, notamment une diminution de la diversité bactérienne, une augmentation des bactéries pro-inflammatoires et une diminution des bactéries bénéfiques. Une revue publiée dans le journal "Pathogens" souligne que la dysbiose intestinale semble jouer un rôle clé dans la pathogenèse des MICI en modulant les interactions entre le microbiote, l'immunité innée et l'immunité adaptative (Khan et al., 2019).

La dysbiose intestinale peut contribuer à l'inflammation chronique observée dans les MICI en perturbant l'homéostasie de la muqueuse intestinale et en activant les réponses immunitaires inappropriées. De plus, des études expérimentales ont montré que le transfert de microbiote provenant de patients atteints de MICI à des modèles animaux sains pouvait induire des signes d'inflammation intestinale, soutenant ainsi le lien entre la dysbiose et les MICI (Britton et al., 2019).

1.6.2. Le cancer colorectal

Le cancer colorectal (CCR) est l'un des cancers les plus fréquents dans le monde, avec une incidence élevée et une morbidité significative. En termes d'épidémiologie, il est important de souligner que le CCR est plus fréquent chez les personnes âgées, avec une incidence qui augmente progressivement après l'âge de 50 ans (Arnold et al., 2017). En ce qui concerne les facteurs de risque, plusieurs éléments sont associés à un risque accru de

développer un CCR. Parmi les facteurs de risque les plus couramment identifiés figurent les antécédents familiaux de CCR, les polypes colorectaux, les MICI, ainsi que certains syndromes génétiques tels que le syndrome de Lynch (Center et al., 2009; Imperiale et al., 2019).

Le CCR est classé en différents stades en fonction de l'étendue de la propagation de la tumeur dans le côlon et le rectum, ainsi que de la présence ou de l'absence de métastases dans d'autres parties du corps. Les stades du CCR sont généralement déterminés à l'aide de critères tels que la taille de la tumeur, la profondeur d'invasion de la paroi intestinale, l'implication des ganglions lymphatiques et la présence de métastases.

Les stades du CCR sont décrits selon le système de stadification TNM (Tumor Node Metastasis), qui est largement utilisé en oncologie. Voici une brève description des principaux stades :

Stade 0 : Le cancer est limité à la muqueuse, la couche la plus superficielle de la paroi intestinale, et n'a pas envahi les autres couches ni les ganglions lymphatiques. Il est souvent appelé carcinome in situ.

Stade I : La tumeur s'est propagée à travers la muqueuse dans la sous-muqueuse, mais n'a pas envahi les autres couches ni les ganglions lymphatiques.

Stade II : La tumeur s'est propagée à travers toutes les couches de la paroi intestinale, mais n'a pas atteint les ganglions lymphatiques.

Stade III : La tumeur s'est propagée aux ganglions lymphatiques adjacents, mais n'a pas atteint d'autres parties du corps.

Stade IV : La tumeur s'est propagée à des organes éloignés, formant des métastases, tels que le foie, les poumons ou d'autres parties du corps. Ce stade est considéré comme avancé.

Les contaminants alimentaires sont également soupçonnés d'avoir un rôle dans le développement du CCR. Des études épidémiologiques ont suggéré une association entre certains contaminants alimentaires et un risque accru de CCR. Par exemple, une méta-analyse a montré que l'exposition aux nitrates dans l'eau potable était associée à une augmentation du risque de CCR (Schullehner et al., 2018).

Le microbiote intestinal, a récemment émergé comme un facteur potentiellement influant dans le développement du CCR. Des études ont montré des différences significatives dans la composition du microbiote entre les patients atteints de CCR et les individus en bonne santé. Des déséquilibres de la diversité et de la stabilité du microbiote intestinal, ont été associés à l'apparition et à la progression du CCR (Zackular et al., 2013; Rebersek, 2021). Certaines espèces bactériennes spécifiques, telles que *Fusobacterium nucleatum*, ont été identifiées comme étant plus abondantes dans les tissus cancéreux colorectaux (C. Sun et al., 2019). Le microbiote intestinal peut également influencer la réponse aux traitements anticancéreux et jouer un rôle dans la prédiction du pronostic et de la survie des patients atteints de CCR (Geller et al., 2017).

2. Exploration fondamentale du foie : Aperçu de ses caractéristiques principales

2.1. Organisation anatomique du foie

Le foie est un organe vital situé dans la cavité abdominale, principalement dans le quadrant supérieur droit. Il est le plus grand organe interne du corps humain et joue un rôle crucial dans de nombreuses fonctions physiologiques. L'anatomie du foie est caractérisée par sa structure lobulaire, sa vascularisation abondante et sa composition cellulaire complexe.

Le foie est composé de lobes, qui sont des structures segmentées fonctionnelles. Chaque lobe est subdivisé en lobules hépatiques, qui sont les unités anatomiques et fonctionnelles de base du foie. Les lobules hépatiques sont constitués de cellules hépatiques, appelées hépatocytes, disposées en couches radiales autour d'une veine centrale. Ces cellules sont organisées en plaques, séparées par des espaces vasculaires appelés sinusoides hépatiques, où le sang provenant des artères hépatiques et des veines porte afflue pour être filtré et métabolisé par les hépatocytes.

La vascularisation du foie est assurée par la veine porte, qui transporte le sang riche en nutriments provenant de l'intestin vers le foie, ainsi que par les artères hépatiques, qui fournissent au foie un apport sanguin oxygéné. Ces vaisseaux sanguins se ramifient à travers le foie, se connectant aux sinusoides hépatiques et assurant la distribution des nutriments et de l'oxygène aux hépatocytes.

En ce qui concerne la composition cellulaire, outre les hépatocytes, le foie comprend d'autres types cellulaires importants. Les cellules de Kupffer, présentes dans les sinusoides hépatiques, sont des macrophages résidents qui jouent un rôle clé dans la phagocytose des débris cellulaires et des microorganismes. Les cellules de étoilées du foie, également appelées cellules Ito, sont responsables de la synthèse et du stockage de la vitamine A, ainsi que de la production de la matrice extracellulaire du foie (Scanlon & Sanders, 2018).

2.2. Organisation histologique du foie

Le foie présente une structure histologique complexe composée de plusieurs types cellulaires interagissant de manière étroite pour assurer les fonctions essentielles de cet organe. Les hépatocytes, constituent la majorité des cellules du foie et sont responsables de nombreuses fonctions métaboliques, synthétiques et détoxifiantes. Ils sont organisés en lobules hépatiques, qui sont les unités fonctionnelles du foie (Tóth, 2007).

Le tissu conjonctif du foie, appelé stroma hépatique, est essentiel pour maintenir la structure et la fonction de l'organe. Il est composé de cellules non parenchymateuses, notamment les cellules de Kupffer, les cellules endothéliales sinusoidales et les cellules étoilées hépatiques. Les cellules de Kupffer sont des macrophages résidents situés dans les sinus hépatiques, responsables de la phagocytose des agents pathogènes et des débris cellulaires. Les cellules endothéliales sinusoidales forment une paroi vasculaire spéciale et facilitent les échanges entre le sang et les hépatocytes. Les cellules étoilées hépatiques sont impliquées dans la production et le remodelage de la matrice extracellulaire.

Un autre type cellulaire important du foie est représenté par les cellules de la voie biliaire, qui sont responsables de la production et de l'excrétion de la bile. Les cellules épithéliales biliaires tapissent les canalicules biliaires, qui sont de minuscules canaux entre les hépatocytes, et conduisent à la formation des canaux biliaires de plus grande taille. Les canaux biliaires se regroupent pour former les canaux hépatiques, qui se connectent finalement aux voies biliaires principales.

Chaque type cellulaire du foie joue un rôle spécifique dans les fonctions physiologiques de l'organe. Les hépatocytes assurent la synthèse et le métabolisme des nutriments et la détoxification des substances nocives. Les cellules de Kupffer participent à la défense immunitaire et à la phagocytose. Les cellules endothéliales sinusoidales facilitent les échanges entre le sang et les hépatocytes, tandis que les cellules étoilées hépatiques sont impliquées dans la production et le remodelage de la matrice extracellulaire. Les cellules de la voie biliaire sont responsables de la production et de l'excrétion de la bile (figure 3).

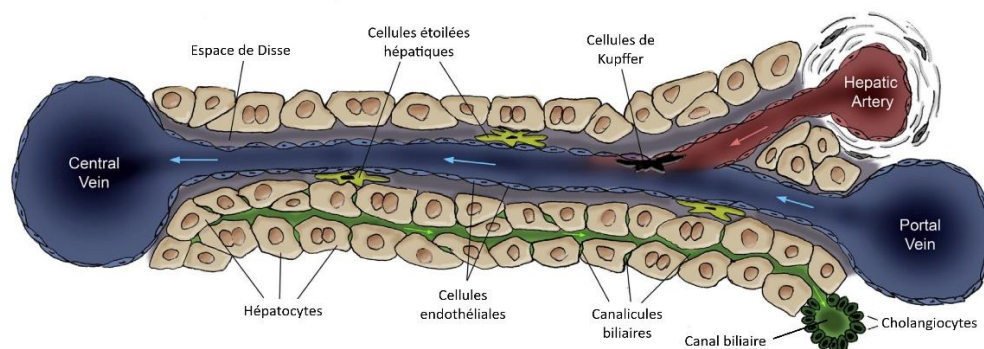


Figure 3 : Organisation cellulaire du foie. Adaptée de Fanti et al., 2017

2.3. Fonctions physiologiques principales du foie

Le foie est un organe multifonctionnel qui exerce de nombreuses fonctions physiologiques essentielles au bon fonctionnement de l'organisme humain. Ses principales fonctions sont la synthèse, le métabolisme, la détoxification, la sécrétion et le stockage (Hall, 2015).

Au niveau de la synthèse, le foie est responsable de la production de nombreuses substances biologiques. Il synthétise notamment des protéines plasmatiques telles que l'albumine, les facteurs de coagulation et les enzymes impliquées dans la digestion.

En matière de métabolisme, le foie occupe une position centrale en régulant les glucides, les lipides et les protéines. Il stocke le glucose sous forme de glycogène, qu'il libère dans le sang lorsque les niveaux de glucose sont bas. De plus, le foie participe à la dégradation des acides gras, à la synthèse du cholestérol et à la transformation des acides aminés en composés utilisables par l'organisme.

Le métabolisme lipidique dans le foie est un processus complexe, guidé par différentes étapes cruciales. Initialement, les acides gras, provenant de diverses sources telles que l'alimentation ou les tissus adipeux, sont captés par les hépatocytes, où des récepteurs membranaires comme CD36 jouent un rôle essentiel dans leur absorption. Une fois à l'intérieur des cellules hépatiques, ces acides gras subissent une activation en se liant à la coenzyme A, formant des acyl-CoA. Ces acyl-CoA peuvent être utilisés pour synthétiser des triglycérides, la principale forme de stockage des lipides, ou être dirigés vers la bêta-oxydation pour produire de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). Le gène ACACA (Acetyl-CoA Carboxylase Alpha) régule cette activation des acides gras, contribuant ainsi à la disponibilité d'acétyl-CoA, un précurseur essentiel de la synthèse des différents lipides (Chandel, 2021).

Une partie de ces acyl-CoA est orientée vers la voie de la synthèse du cholestérol, également connue sous le nom de voie de l'hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA réductase (voie HMG-CoA), qui implique plusieurs étapes enzymatiques. ACACA intervient également dans la régulation de cette activation des acides gras, favorisant la disponibilité d'acétyl-CoA nécessaire à la synthèse du cholestérol.

Parallèlement, le foie est impliqué dans la lipogénèse, un processus où les acides gras sont synthétisés à partir de précurseurs tels que l'acétyl-CoA. ACACA joue là aussi un rôle clé en catalysant la carboxylation de l'acétyl-CoA dans ce processus. Les acides gras nouvellement synthétisés peuvent être incorporés dans les triglycérides ou libérés dans la

circulation sanguine sous forme de lipoprotéines, avec la participation du gène MTTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein) dans le transport des triglycérides pour la formation des lipoprotéines (Chandel, 2021).

La fonction de détoxification du foie est cruciale pour éliminer les substances nocives de l'organisme (figure 4). Il neutralise et élimine les toxines, les médicaments et les substances étrangères, en les transformant en métabolites plus facilement excrétés par les voies biliaires ou rénales. Les xénobiotiques peuvent traverser la membrane cellulaire par diffusion ou en utilisant des transporteurs membranaires spécifiques, connus sous le nom de pompes d'influx, tels que le transporteur de cation organique (OCT). Une fois à l'intérieur de la cellule, ces xénobiotiques sont soumis aux enzymes des phases I et II du métabolisme des xénobiotiques, ou bien ils peuvent être éliminés par des transporteurs membranaires spécialisés, appelés pompes d'efflux, comme la P-glycoprotéine (P-gp), permettant ainsi l'exportation directe de la molécule hors de la cellule. Durant la phase I, également appelée phase de fonctionnalisation, les xénobiotiques subissent généralement des réactions d'oxydo-réduction, souvent catalysées par les cytochromes P450 (CYP). L'objectif de cette phase est de rendre la molécule plus polaire et d'augmenter son hydrophilie, facilitant ainsi son élimination. Pendant la phase de conjugaison, les xénobiotiques devenus plus hydrophiles par l'oxydo-réduction, subissent une nouvelle modification sous l'influence d'enzymes de la phase II telles que la Glutathion S-transférase (GST) ou les UDT-Glucuronyltransférases (UGT). Ces enzymes introduisent des groupements hydrophiles sur les métabolites, réduisant ainsi leur caractère hydrophobe et facilitant leur expulsion hors de la cellule par des pompes d'efflux telles que le Multidrug Resistance Protein (MRP) (Croom, 2012).

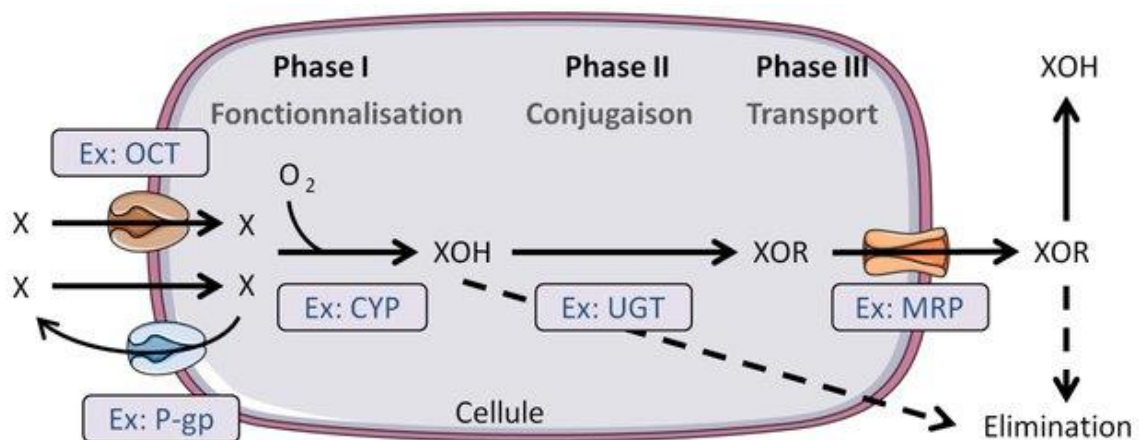


Figure 4 : Schéma général de la métabolisation des xénobiotiques (Le Goff, 2020)

Le foie est également impliqué dans la sécrétion de nombreuses substances essentielles à la digestion et à l'absorption des nutriments. Il sécrète la bile, qui est stockée dans la vésicule biliaire et libérée dans l'intestin pour émulsionner les graisses et faciliter leur digestion. De plus, le foie sécrète des substances telles que l'IGF-1 (insulin-like growth factor 1) qui joue un rôle dans la croissance et le développement.

Enfin, le foie joue un rôle de stockage pour différentes substances. Il stocke le glycogène, qui est une réserve d'énergie, ainsi que les vitamines liposolubles (A, D, E, K) et le fer. Il est également impliqué dans la dégradation des globules rouges et le stockage de la vitamine B12.

2.4. Principales pathologies du foie

L'hépatite est une inflammation du foie, souvent engendrée par une infection virale telle que l'hépatite A, B ou C, ou d'autres facteurs tels que la consommation excessive d'alcool, les toxines hépatiques ou les maladies auto-immunes (Dooley et al., 2011). Cette inflammation conduit à des dommages au niveau des cellules hépatiques, perturbant ainsi leur fonctionnement normal. En cas de persistance, cela peut mener à une destruction graduelle des hépatocytes, à une fibrose hépatique et, éventuellement, à une cirrhose.

La stéatose hépatique, également appelée NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease), résulte d'une perturbation complexe du métabolisme lipidique au niveau du foie. Lorsque l'équilibre entre l'apport de graisses dans le foie (par le biais de l'alimentation et du tissu adipeux) et leur utilisation (via la β -oxydation et la synthèse de lipoprotéines) est altéré, les hépatocytes commencent à accumuler des triglycérides, principalement sous forme de gouttelettes lipidiques. Cette accumulation peut être exacerbée par une résistance à l'insuline, caractéristique de l'obésité et du diabète de type 2. Les lipides intracellulaires, notamment les acides gras libres et les dérivés lipidiques, peuvent induire un stress oxydant et une altération de la fonction mitochondriale, activant ainsi des voies de signalisation inflammatoires (Younossi et al., 2019).

La NASH (Non-Alcoholic Steatohepatitis), en revanche, dépasse le simple stade d'accumulation lipidique. L'inflammation joue un rôle crucial dans la NASH et résulte d'une série d'interactions complexes entre les lipides, les cellules hépatiques et les cellules immunitaires. Les adipokines, cytokines et autres facteurs inflammatoires émanant du tissu adipeux et du foie contribuent à l'infiltration de cellules immunitaires, principalement des macrophages, dans le foie. Cette réponse inflammatoire chronique, combinée à la

production de radicaux libres due au stress oxydant, peut causer des lésions aux hépatocytes et aux tissus environnants (Fraile et al., 2021). La NASH peut ensuite évoluer vers la fibrose hépatique, qui à son tour peut progresser vers la cirrhose.

La fibrose et la cirrhose hépatique sont deux affections majeures touchant le foie et ayant des répercussions graves sur la santé. La fibrose hépatique est la première étape de la détérioration du foie, généralement causée par des facteurs tels que l'alcoolisme chronique, les hépatites virales ou la NAFLD. À mesure que la fibrose progresse, le tissu conjonctif s'accumule dans le foie, altérant sa structure normale et affectant ses fonctions essentielles. Cette fibrose résulte d'une réponse anormale de cicatrisation, dans laquelle les cellules hépatiques endommagées libèrent des cytokines inflammatoires et des facteurs de croissance. Ces signaux activent les cellules du tissu conjonctif du foie, appelées cellules étoilées hépatiques, qui se transforment en myofibroblastes. Ces derniers produisent et déposent une matrice extracellulaire riche en collagène (Puche et al., 2013). La fibrose initiale, dénommée stade F0, présente peu de fibrose significative, tandis que le stade F4 correspond à la cirrhose, caractérisée par une fibrose avancée et une structure hépatique modifiée (Bedossa et al., 2015). En l'absence de traitement de la cause sous-jacente, la fibrose peut évoluer en cirrhose hépatique, un stade avancé marqué par une altération irréversible de la fonction hépatique normale et de l'architecture du foie. La cirrhose résulte généralement de processus chroniques de dommages hépatiques et peut être déclenchée par divers facteurs, tels que l'hépatite C, l'abus d'alcool et les maladies génétiques du foie. La cirrhose peut déclencher des complications graves, notamment une insuffisance hépatique, une hypertension portale, le développement de nodules régénératifs et une prédisposition accrue au carcinome hépatocellulaire.

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le type le plus courant de cancer primaire du foie et peut survenir chez les individus atteints de cirrhose, d'hépatite virale chronique, de maladies génétiques du foie ou exposés à des toxines hépatiques (Forner et al., 2018).

3. Toxicologie alimentaire : Exploration des contaminants chimiques de nos denrées alimentaires

Un aliment est une substance consommée pour fournir de l'énergie et favoriser la croissance et la santé. Les aliments sont généralement classés en trois catégories : les glucides, les lipides et les protéines. Les glucides sont des sucres et de l'amidon, qui sont utilisés comme source d'énergie pour le corps. Les lipides sont des graisses, qui ont également un rôle énergétique, mais qui ont aussi un rôle structurel dans les membranes cellulaires. Les protéines sont des molécules complexes qui sont utilisées pour construire et réparer les tissus du corps. Les aliments contiennent également des vitamines et des minéraux, qui sont essentiels pour maintenir une bonne santé. Toutes ces sources d'aliments, l'Homme les retrouve dans les denrées alimentaires qui sont des produits comestibles destinés à la consommation humaine. Elles peuvent être d'origine animale ou végétale et être sous forme brute ou transformée. Les denrées alimentaires comprennent des aliments tels que les fruits, les légumes, les viandes, les produits laitiers, les céréales, les huiles, les épices et les boissons. Les denrées alimentaires peuvent être vendues sous forme brute ou transformée, comme des produits frais, congelés, en conserve ou séchés.

Aujourd'hui, la contamination de nos denrées alimentaires ne fait plus aucun doute comme le montre de nombreuses publications scientifiques mettant en évidence la présence de produits chimiques dans la totalité des produits consommés par l'Homme (Hussain, 2016; Rather et al., 2017; Lebelo et al., 2021). Les contaminants chimiques alimentaires peuvent se retrouver dans les aliments de différentes manières, par exemple lors de la production, du stockage, du transport ou de la préparation des aliments. Les contaminants peuvent être des produits chimiques naturels, tels que les toxines produites par des micro-organismes, ou des produits chimiques artificiels, tels que les pesticides, les additifs alimentaires, les métaux lourds ou les produits pharmaceutiques. La consommation de ces contaminants est fortement suspectée pour causer des effets nocifs sur la santé, tels que des maladies chroniques, des troubles neurologiques, des problèmes de reproduction ou des cancers (Choudhury et al., 2022).

3.1. Les sources des contaminants alimentaires

Il existe plusieurs sources de contamination des denrées alimentaires, notamment :

Par des substances biologiques naturelles comme les toxines

Les toxines alimentaires peuvent être présentes dans les aliments crus ou mal cuits, ou dans les aliments qui ont été stockés sur de longues périodes. Cette contamination dite « naturelle » est liée à la présence normale ou accidentelle, de micro-organismes tel que les bactéries comme les salmonelles, les staphylocoques et les *Escherichia coli* qui peuvent produire des toxines pouvant provoquer des symptômes tels que des nausées, des vomissements, de la fièvre, des douleurs abdominales et de la diarrhée. L'intoxication par ces toxines peu laisser aux consommateurs de graves séquelles voir même être mortelle chez les plus jeunes. Les toxines qui contaminent nos aliments peuvent aussi être issues de moisissures présentes sur l'aliment, on parlera ici de mycotoxines. Les plus courantes sont l'aflatoxine, le déoxynivalénol, la zéaralénone et l'ochratoxine A, on les retrouve le plus souvent dans des aliments tels que les céréales, les noix et les fruits secs. La contamination aux mycotoxines peut causer une variété de problèmes de santé, y compris des maladies hépatiques, des problèmes neurologiques et des cancers (Alshannaq & Yu, 2017).

Par des substances chimiques néoformées

Les substances néoformées sont des composés qui se forment lors de la transformation des aliments. Ils peuvent être créés lors de la cuisson, du traitement thermique et de la transformation chimique des aliments. Certaines de ces substances peuvent être nocives pour la santé humaine lorsqu'elles sont consommées en grande quantité. Parmi ces substances néoformées, on retrouve les produits finaux de la glycation avancée, Advanced Glycation End products (AGE) qui sont des protéines ou des lipides qui ont été modifiés par des réactions chimiques avec des sucres. Les AGE sont produits naturellement dans le corps, mais des niveaux élevés peuvent être associés à des maladies chroniques telles que le diabète, les maladies cardiovasculaires, la maladie d'Alzheimer ou encore les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Prasad et al., 2019). Un autre exemple de ces produits néoformés, est l'acrylamide, bien connu dans les laboratoires pour son utilisation dans certaines techniques comme l'électrophorèse en gel de polyacrylamide il est surtout connu pour son caractère toxique car il fait partie des substances dites CMR pour cancérogène, mutagène et reprotoxique. On retrouve de l'acrylamide dans notre alimentation notamment lors de la cuisson à haute température de certains aliments, tels

que les pommes de terre, les frites et les chips (Koszucka et al., 2020). L'acrylamide a été associé à certains types de cancer chez les animaux de laboratoire ; il a été classé dans le groupe 2A par le centre international de recherche sur le cancer.

Par des contaminants chimiques environnementaux

Les contaminants chimiques environnementaux sont des substances chimiques qui sont libérées dans l'environnement. Parmi eux on peut citer les métaux lourds tels que le plomb, le mercure, l'aluminium et le cadmium qui peuvent être libérés dans l'environnement par des sources industrielles et minières, ainsi que par des déchets électroniques et des batteries (Kumar et al., 2019), ils sont fortement suspectés pour induire ou aggraver certaines pathologie chroniques comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Abegunde et al., 2016).

On retrouve aussi d'autres types de contaminants comme les pesticides qui sont des substances chimiques utilisées pour tuer les insectes et les mauvaises herbes, et peuvent être retrouvés dans l'eau et les aliments, c'est notamment le cas du glyphosate, qui est l'ingrédient actif de l'herbicide Roundup (Bayer). Le glyphosate est utilisé pour tuer les mauvaises herbes dans les cultures telles que le soja, le maïs et le blé. Des traces de glyphosate ont été retrouvées dans des aliments tels que les céréales pour petit déjeuner, les pâtes et les légumes en conserve et certaines études établissent un lien entre pathologies (notamment le cancer du foie) et la présence de ce contaminant alimentaire (Mesnage et al., 2022).

Les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques) sont un groupe de composés organiques qui se forment lors de la combustion incomplète de matières organiques telles que le charbon, le pétrole et le bois. Les HAP peuvent être présents dans l'environnement et dans les aliments, et certaines formes de HAP ont été associées à des effets sur la santé humaine tels que le cancer (Låg et al., 2020).

Enfin, de par sa production et son utilisation de plus en plus importantes, le plastique représente un contaminant majeur de notre alimentation (Rubio-Armendáriz et al., 2022). Le plastique peut contaminer les aliments de différentes manières, notamment en raison de la pollution par les déchets plastiques de l'eau et des sols et de la contamination des aliments pendant la production, la transformation et l'emballage. Ce sont principalement de petits fragments de plastique appelés micro- et nano-plastiques que l'on retrouve dans notre alimentation. Les microplastiques peuvent être fabriqués à partir de nombreux types de

polymères, tels que le polyéthylène, le polypropylène et le polystyrène. De plus, les plastiques peuvent contenir des produits chimiques tels que les phtalates et les bisphénols, qui peuvent migrer dans les aliments et causer des effets sur la santé. L'impact à long terme de l'exposition aux divers polymères de plastique et des produits chimiques qu'ils véhiculent est encore mal compris, mais il y a des préoccupations quant aux effets sur la santé humaine et l'environnement (Campanale et al., 2020).

Cette thèse se focalisera sur l'étude de deux types de contamination alimentaire : la contamination naturelle par la mycotoxine déoxynivalénol et la contamination anthropique par les microplastiques de polyéthylène. Ces deux formes de contamination suscitent des préoccupations croissantes en raison des risques potentiels qu'elles représentent pour la santé humaine. Il est donc primordial de comprendre leur impact, non seulement sur la santé générale, mais aussi sur la santé des populations vulnérables telles que les enfants et les personnes atteintes de maladies chroniques. Cette recherche vise à approfondir notre compréhension de l'impact de ces contaminations alimentaires et à fournir des informations essentielles pour prendre des mesures de protection et de prévention appropriées.

3.2. Cas des mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques produites naturellement par des moisissures qui se développent sur les cultures, les aliments et les fourrages. Les moisissures produisent ces toxines pour se protéger contre les autres organismes et pour aider à leur croissance (J. F. Leslie & Summerell, 2006). Elles peuvent être produites par différents types de moisissures, telles que *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Les conditions environnementales, telles que l'humidité, la température et la durée de stockage, peuvent favoriser ou inhiber la croissance des moisissures et la production de mycotoxines. Les mycotoxines peuvent se trouver dans divers aliments tels que les céréales, les noix, les fruits secs et les épices, et leur consommation excessive peut présenter un risque pour les humains et les animaux. Ces risques vont de l'empoisonnement aigu à des effets à long terme tels que des altérations du système immunitaire, des problèmes de reproduction et même le développement de cancers (Janik et al., 2020).

Les mycotoxines peuvent être classées en plusieurs familles, chacune ayant des effets toxiques différents sur les humains et les animaux. Les aflatoxines sont produites par les moisissures *Aspergillus* et sont courantes dans les noix et les céréales. Les fumonisines sont produites par les moisissures *Fusarium* et peuvent être trouvées dans les céréales, en particulier le maïs. Les ochratoxines sont produits par les moisissures *Aspergillus* et

Penicillium et peuvent être trouvées dans les céréales, les fruits secs et les épices. Les zéaralénones sont produits par les moisissures *Fusarium* et sont courants dans les céréales telles que le maïs. Enfin, il y a la famille des trichothécènes divisée en deux catégories. Les trichothécènes de catégorie A comprennent plusieurs toxines, telles que la toxine T-2, la toxine HT-2, la toxine diacétyl T-2 et la toxine neosolaniol. Les trichothécènes de catégorie B sont généralement produites par certaines espèces du genre *Fusarium*, qui se développent sur les céréales telles que le blé, le maïs et l'orge. Dans cette catégorie on retrouve la fusarénone et le nivalénol mais le déoxynivalénol (DON) est l'un des membres les plus courants de cette famille de mycotoxines (Mahato et al., 2022).

3.2.1. Le déoxynivalénol

Le DON est l'une des mycotoxines les plus répandues dans le monde. Elle est principalement produite par *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* et *Fusarium crookwellense*. Ces espèces de *Fusarium* infectent les céréales telles que le blé, le maïs, l'orge et l'avoine. Étant donné que le DON n'est que partiellement détruit par la haute température lors du traitement, il peut être détecté dans les produits alimentaires et les boissons transformés tels que les céréales pour le petit-déjeuner, le pain, la pizza, la bière et le vin. Cette mycotoxine représente un véritable problème de santé car elle peut entraîner des effets toxiques sur la santé humaine et animale. Les effets varient en fonction de la dose et de la durée d'exposition, mais ils incluent généralement des symptômes tels que des vomissements, des diarrhées, des douleurs abdominales, des effets immunosuppresseurs et des perturbations endocriniennes (Mahato et al., 2022).

3.2.2. Occurrence du DON au niveau mondial

BIOMIN, une entreprise mondiale axée sur la santé animale, la nutrition et les biosciences, a publié en avril 2023 les résultats de son enquête menée en 2021 sur les mycotoxines. Cette enquête met en évidence la fréquence des contaminants métaboliques fongiques dans les cultures fourragères et évalue les risques potentiels qu'ils représentent pour les animaux d'élevage à l'échelle mondiale. À partir de l'analyse de plus de 24 000 échantillons d'ingrédients destinés à l'alimentation animale collectés dans 75 pays, cette étude examine en détail la présence de ces contaminants et leur impact possible sur la santé animale. Les résultats ont montré que les menaces liées aux mycotoxines pour la production de protéines animales restent élevées par rapport aux années précédentes. À l'échelle mondiale, près des deux tiers des échantillons contenaient au moins une mycotoxine dépassant les niveaux recommandés. Les régions les plus affectées par la menace potentielle en déoxynivalénol

dans la récolte de céréales en Europe sont l'Europe occidentale et méridionale avec des prévalences respectives de 64 % et 58 %. (Figure 5)

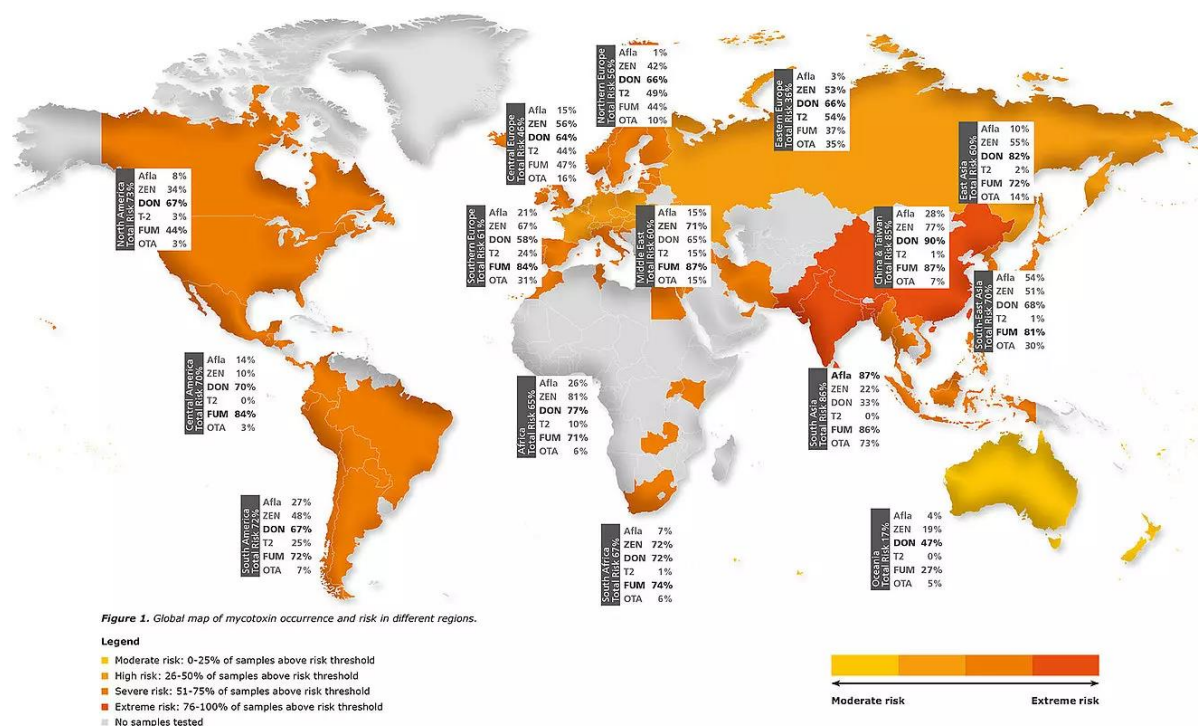


Figure 5 : Carte mondiale de la prévalence et des risques en mycotoxines dans différentes régions (DSM World Mycotoxine Survey 2021).

3.2.3. Exposition humaine au DON et réglementation Européenne.

Les niveaux de DON dans les céréales peuvent varier considérablement en fonction de facteurs tels que la région géographique, la saison de récolte, les pratiques agricoles et les méthodes de stockage (Gruber-Dorninger et al., 2019). Les réglementations sur les niveaux de DON dans les aliments varient également selon les pays et les régions. En Europe, les teneurs maximales en DON dans les denrées alimentaires sont fixées par le règlement de la commission européenne (CE No 1881/2006, 2006).

DON est généralement présent dans les céréales pendant les processus de pré-récolte, de traitement, de séchage et de stockage, les producteurs sont donc soumis à des contrôles avec des niveaux en DON n'excédant pas les quantités suivantes :

- Céréales brutes autres que le blé dur, l'avoine et le maïs : 1250 µg/kg
- Blé dur, avoine bruts et maïs brut : 1750 µg/kg
- Céréales destinées à la consommation humaine directe : 750 µg/kg

- Farines de blé tendre et de seigle destinées à la panification : 500 µg/kg
- Semoules de blé dur destinées à la fabrication de pâtes alimentaires : 750 µg/kg

De plus, DON est très résistant à la chaleur et peut supporter des températures allant de 170 à 350°C. Même après un traitement de 30 minutes à 170°C, il n'y a pas de réduction détectée. Cela en fait une source courante de pollution alimentaire dans les produits transformés à base de céréales, il y a donc là aussi des quantités maximales autorisées en DON (H. Zhou et al., 2020).

- Pâtes alimentaires : 750 µg/kg
- Biscuits, pâtisseries et pain d'épices : 500 µg/kg
- Céréales pour petit-déjeuner et en-cas à base de céréales : 750 µg/kg
- Préparations à base de céréales et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge : 200 µg/kg

Ces quantités maximales imposées par la réglementation Européenne ont été mis en place afin de protéger le consommateur d'un risque d'intoxication. En effet, lorsque DON est consommé, il peut causer une toxicité à court et à long terme. Les symptômes aigus comprennent des douleurs abdominales, une perte d'appétit, de la diarrhée, une salivation excessive, des vomissements et une sensation de malaise. Les effets les plus marquants d'une exposition chronique au DON sont des changements dans la digestion alimentaire, avec perte de poids et anorexie (Kamle et al., 2022). En 2001, le Comité mixte FAO/OMS d'experts sur les additifs alimentaires (JECFA) a établi une dose journalière tolérable (DJT) pour le DON de 1 µg/kg de poids corporel en se basant sur une étude chronique chez la souris. Cette étude a permis de déterminer la dose la plus élevée de DON qui n'a pas causé d'effets nocifs observables chez les animaux de laboratoire (dose NOAEL : non observed adverse effect level). La NOAEL chez la souris était de 0,1 mg/kg de poids corporel/jour. Un facteur de sécurité de 100 a été appliqué pour établir la dose journalière tolérable pour les humains. Ces données ont été confirmées en 2002 par le Comité scientifique de l'alimentation humaine (SCF).

Cependant, l'étude de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) de 2017 (Knutzen et al., 2017) qui a examiné l'exposition alimentaire des consommateurs européens au DON révèle que près de 1 % de la population adulte dépasse la dose journalière

tolérable, avec une exposition moyenne en DON de 1,2 µg/kg de poids corporel par jour. Plus inquiétant encore, l'étude a montré que l'exposition moyenne au DON chez les enfants âgés de 1 à 3 ans était de 1,8 µg/kg de poids corporel par jour, soit près de deux fois la DJT établie par le JECFA. L'étude a également souligné que l'exposition au DON peut varier considérablement en fonction des habitudes alimentaires et de la consommation de produits contaminés.

3.2.4. Métabolisme et toxicité du DON

L'absorption de DON chez les animaux dépend de plusieurs paramètres, notamment l'espèce, l'âge et même le sexe. Bien que l'apparition de DON dans le sang après ingestion orale soit rapide, en 15 à 30 minutes dans la plupart des espèces de mammifères, l'étendue de l'absorption varie considérablement, de 7% chez les ruminants (moutons et vaches) à 25% chez le rat, et jusqu'à 89% après une exposition chronique chez le porc (Paulick et al., 2015; Saint-Cyr et al., 2015). La biodisponibilité orale de DON chez les volailles est particulièrement faible, et ce faible taux d'absorption peut expliquer la faible sensibilité des volailles au DON (Osselaere et al., 2013). Les concentrations de DON dans le plasma et les tissus des souriceaux sevrés étaient d'environ deux fois supérieures à celles des souris adultes recevant les mêmes doses de toxine, ce qui indique que DON peut être absorbé plus efficacement chez les jeunes animaux (J. J. Pestka et al., 2008). De même, la comparaison de la biodisponibilité de DON chez les souris mâles et femelles a suggéré que cette mycotoxine peut avoir une absorption et une élimination plus élevée chez les femelles que chez les mâles suggérant une sensibilité plus accrue des souris mâles aux effets toxiques du DON (J. Pestka et al., 2017).

Selon une étude menée par Vidal et al., il a été observé, comme pour l'animal, que la biodisponibilité de DON chez l'Homme était plus élevée chez les enfants que chez les adultes. Cela pourrait suggérer que les enfants sont plus sensibles à l'absorption de DON en raison de leur immaturité intestinale et de leur plus grande exposition alimentaire (Vidal et al., 2018). Dans cette même étude, un groupe de 20 volontaires a été sélectionné et a reçu des instructions pour s'abstenir de consommer des céréales et des aliments à base de céréales pendant 4 jours. Par la suite, ils ont reçu une dose unique de 1 µg/kg de poids corporel de DON, suivi d'une collecte d'urine sur une période de 24 heures. Les résultats de l'analyse ont révélé que 64% de la dose administrée de DON a été retrouvée dans l'urine collectée. Le DON-15-glucuronide a été identifié comme le biomarqueur urinaire le plus prédominant, suivi du DON libre et du DON-3-glucuronide.

Bien que l'intestin grêle soit considéré comme le principal site d'absorption du DON, les mécanismes impliqués dans le transport de cette mycotoxine dans les cellules de mammifères restent incertains. Les cellules intestinales et les cellules hépatiques sont les premières à entrer en contact avec le DON. Dans leur étude, Li et al. ont démontré que le transport du DON dans les cellules de mammifères est régulé par des transporteurs spécifiques et est dépendant de l'énergie (X. Li et al., 2017). La P-glycoprotéine (P-GP) est le principal transporteur d'efflux dans les cellules intestinales et hépatocytaires, tandis que les transporteurs d'entrée du DON sont les polypeptides transporteurs d'anions organiques (OATPs), les transporteurs d'anions organiques (OATs) et les transporteurs de cations organiques (OCTs).

Le métabolisme du DON est un processus complexe qui implique plusieurs étapes enzymatiques. Le DON est principalement métabolisé dans le foie, où il subit une série de réactions biochimiques pour former des métabolites plus hydrophiles qui peuvent être excrétés dans les urines et les selles. Les enzymes du cytochrome P450 (CYP) sont les premières enzymes impliquées dans le métabolisme du DON, et elles peuvent bioactiver ou détoxifier le composé. Les CYP2B1 et CYP2B2 sont les isoformes de CYP les plus actifs pour métaboliser le DON (V. N. Tran et al., 2020). Le métabolisme du DON commence par une hydroxylation du groupe méthyle en position 3 du squelette tricyclique, catalysée par les CYP, pour former le 3-hydroxy-DON (3-ADON) ou le 3-épi-DON (3-épi-DON). Le 3-ADON est ensuite métabolisé en 3-keto-DON (3-KD) par une réaction d'oxydation catalysée par les CYP. Le 3-épi-DON est métabolisé en 3-épi-3-KD par une réaction de déhydrogénation catalysée par les CYP. La glucuronidation est la seconde étape qui convertit le DON en DON-(3-8-15)-glucuronide, une forme moins toxique. La glucuronidation est catalysée par l'enzyme UDP-glucuronosyltransférase (UGT) (Y. Wang et al., 2022).

Le microbiote intestinal joue également un rôle important dans la métabolisation du DON. Certaines bactéries intestinales ont la capacité de déconjuguer l'acetyl-DON, une forme moins toxique du DON, et de le convertir en DON libre, la forme plus toxique. Cette conversion est due à l'activité de certaines bactéries intestinales (A. P. F. L. Bracarense et al., 2020). On parle ici du cycle entéro-hépatique du DON qui est un processus où certaines formes de DON sont excrétées dans la bile et passe dans l'intestin où elles peuvent être déconjuguées par les bactéries intestinales pour reformer le DON libre. Cela permet au DON de subir un cycle entéro-hépatique, où il peut être réabsorbé et réutilisé plusieurs fois avant d'être finalement excrété dans les selles (figure 6). Selon une étude de Goyarts et al.,

le cycle entéro-hépatique du DON est un processus important qui permet au DON de rester plus longtemps dans le corps et d'exercer ses effets toxiques (Goyarts et al., 2007). Selon d'autres études, les bactéries intestinales peuvent également modifier la structure chimique du DON en le transformant en d'autres métabolites, tels que le 3-epi-DON et le DOM-1, qui sont moins toxiques que le DON. La transformation du DON en 3-epi-DON est catalysée par certaines bactéries intestinales, telles que les bactéries du genre *Bifidobacterium*, tandis que la transformation du DON en DOM-1 est catalysée par l'enzyme époxyde hydrolase (Berthiller et al., 2011; Pinto et al., 2022).

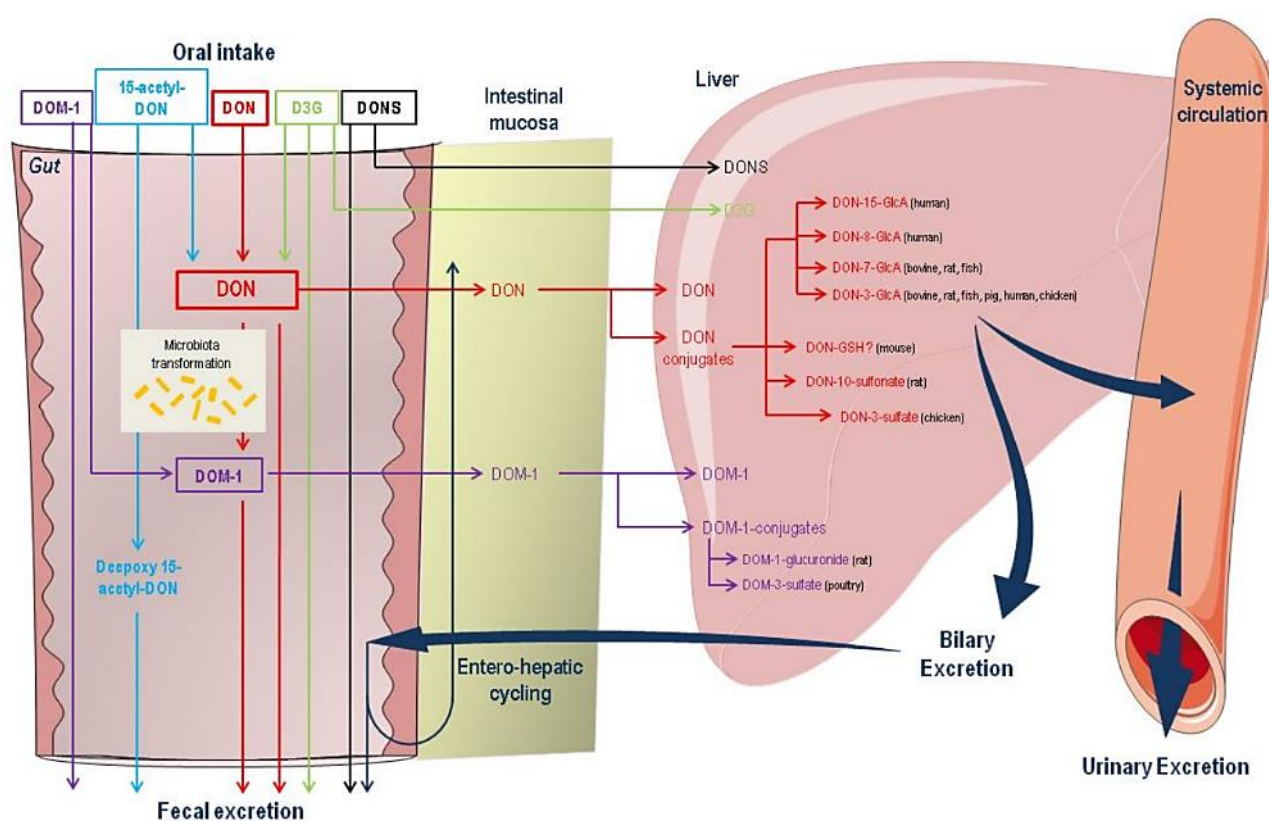


Figure 6 : Métabolisme du DON et de ses formes acétylées et modifiées chez les humains et les animaux. (Payros et al., 2016)

De nombreuses études toxicologiques ont documenté les effets perturbateurs du DON sur plusieurs aspects de la physiologie intestinale :

Altération de la fonction de barrière intestinale : De nombreuses études réalisées chez l'animal, notamment chez le porc (Pinton et al., 2012; Xue et al., 2022), le poulet (Ghareeb et al., 2015; Awad et al., 2019) et la souris (Akbari et al., 2014; Song et al., 2022), ont démontré les effets du DON sur la fonction de barrière intestinale. Ces effets sont attribués à différents mécanismes, tels que l'interaction directe avec des protéines de jonction serrée, notamment l'occludine et la claudine (Pinton et al., 2009), l'activation de la voie de

signalisation du NF- κ B (nuclear factor-kappa B) et la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) et l'IL-8 (interleukine 8) (Van De Walle et al., 2008; Pinton et al., 2012; X. Wang et al., 2019), ainsi que l'augmentation de la production de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules intestinales, entraînant un stress oxydant et des dommages cellulaires. Ces protéines de jonction jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale. L'altération de ces protéines entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale, facilitant le passage de toxines et de bactéries dans la circulation sanguine. Dans les études sur l'Homme, des lignées épithéliales intestinales telles que les Caco-2 ont été principalement utilisées, et des effets similaires à ceux observés *in vivo* chez l'animal ont été rapportés (Akbari et al., 2014; X. Wang et al., 2019). D'autres études ont utilisé des modèles plus complexes, tels que des cocultures d'épithélium intestinal en inserts ou des modèles de colonoïdes ou d'entéroïdes, et ont également montré une altération de la fonction de barrière intestinale (Hanyu et al., 2020).

Induction d'inflammation intestinale : Le DON est connu pour induire une inflammation dans l'intestin. Il peut activer différentes voies de signalisation inflammatoires dans les cellules intestinales. Cela inclut l'activation de la voie NF- κ B un facteur de transcription clé qui régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (X. Wang et al., 2019). L'activation du NF- κ B par le DON conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires, de molécules d'adhésion cellulaire et d'enzymes inflammatoires.

Le DON peut également activer la voie de signalisation des MAPK (Mitogen-activated protein kinases), qui comprend les kinases extracellulaires régulées par les signaux mitogènes (ERK), les kinases c-Jun N-terminal (JNK) et les kinases p38. L'activation de cette voie entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires et la stimulation de la réponse immunitaire (H. Zhang et al., 2020).

Enfin, il a été reporté une activation des cellules immunitaires intestinales telles que les macrophages, les lymphocytes et les cellules dendritiques. DON peut induire la libération de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interleukine-1 β (IL-1 β), l'interleukine-6 (IL-6) et le TNF- α , qui recrutent et activent d'autres cellules immunitaires (Cano et al., 2013; Vatzia et al., 2019). Le DON peut également perturber l'équilibre entre les cellules immunitaires pro-inflammatoires et anti-inflammatoires dans l'intestin. Une étude menée par Payros et al. a montré que le DON augmente l'accumulation de lymphocytes T CD4⁺ pro-inflammatoires, tout en inhibant la prolifération des lymphocytes T régulateurs (Tregs) anti-inflammatoires

(Payros et al., 2020). Cela favorise un environnement inflammatoire dans l'intestin et contribue à la progression de l'inflammation.

Altération de la prolifération cellulaire : Des études ont mis en évidence les mécanismes par lesquels le DON affecte la prolifération cellulaire. Plusieurs études ont montré que le DON entraîne une inhibition de la prolifération cellulaire en augmentant l'expression de protéines régulatrices négatives du cycle cellulaire, telles que p21 et p27, et en réduisant l'activité des kinases cycline-dépendantes (CDKs), ce qui provoque un arrêt du cycle cellulaire et une diminution de la prolifération (Payros et al., 2016). Une autre étude menée par Cao et al. a révélé que le DON induit l'apoptose cellulaire en activant la voie de signalisation de l'apoptose, notamment par l'activation des caspases et la modulation des protéines Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (Cao et al., 2021). Ces résultats suggèrent que le DON peut induire la mort cellulaire programmée en perturbant l'équilibre entre les facteurs pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. De plus, une étude distincte (Pan et al., 2014) a démontré que le DON inhibe la synthèse des protéines en perturbant la fonction des ribosomes. Ils ont observé une diminution de l'incorporation des acides aminés dans les protéines, ce qui entraîne une réduction de la prolifération cellulaire.

Les études sur l'augmentation de la prolifération cellulaire en présence de DON sont relativement limitées par rapport aux études sur l'inhibition de la prolifération. Cependant, il existe quelques recherches qui ont exploré cet aspect.

Une étude publiée en 2014 par Mishra et al. a montré que le DON pouvait stimuler la prolifération cellulaire dans les cellules de peau murine (Mishra et al., 2014). Les chercheurs ont observé une augmentation significative de l'incorporation de la thymidine tritiée, qui est un marqueur couramment utilisé pour évaluer la prolifération cellulaire, dans les cellules exposées au DON. Ils ont également constaté une augmentation de l'expression des protéines impliquées dans la régulation positive du cycle cellulaire, telles que la cycline D1 et les CDKs.

D'autres études se sont intéressées à l'effet pro-prolifératif du DON au niveau digestif. Par exemple, une étude menée par Bracarense et al. a démontré qu'une alimentation contaminée par du DON induisait une hyperprolifération hépatocytaire chez les rats (A. P. F. L. Bracarense et al., 2017). Ces résultats suggèrent que le DON peut affecter la régulation de la prolifération cellulaire dans le foie. Par ailleurs, une autre étude a examiné les effets du DON sur les cellules épithéliales humaines Caco-2. Les chercheurs ont constaté qu'à faible concentration de DON (0,37 μ M), cette mycotoxine provoquait des effets pro-

prolifératifs sur ces cellules épithéliales (Manda et al., 2015). Ces observations indiquent que le DON peut stimuler la prolifération cellulaire dans les cellules épithéliales humaines.

Enfin, quelques études ont montré une augmentation de la profondeur des cryptes intestinales par le DON. Cette augmentation des cryptes intestinales associée à une augmentation de l'expression de marqueurs de prolifération cellulaire, tels que la Ki67 pourrait indiquer une stimulation de la prolifération cellulaire dans la couche basale de l'épithélium intestinal (Vignal et al., 2018; Wu et al., 2018).

Ces différentes études suggèrent que le DON peut avoir des effets biphasiques sur la prolifération cellulaire, avec des études montrant à la fois une inhibition et une augmentation de la prolifération.

Perturbation du microbiote intestinal : Les données concernant l'interaction entre le DON et le microbiote intestinal sont encore limitées mais en expansion. Des études récentes ont montré que le DON peut perturber la composition et la diversité du microbiote intestinal chez les animaux d'élevage tels que les poulets et les porcs. Le DON peut entraîner des changements dans les populations bactériennes, favorisant la croissance de certaines espèces et réduisant celle d'autres. Par exemple, il a été observé une augmentation de *Prevotella* et une diminution de certaines bactéries bénéfiques telles que *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* (B. Jia et al., 2023).

Ces altérations du microbiote intestinal peuvent avoir des conséquences sur la santé et la performance des animaux. Le microbiote joue un rôle important dans la digestion, l'absorption des nutriments, la régulation immunitaire et la protection contre les agents pathogènes. Ainsi, toute perturbation de son équilibre peut affecter la fonction intestinale et la santé globale de l'Homme et l'animal.

Une étude supplémentaire s'est penchée sur l'effet du DON sur des bactéries connues pour leur potentiel génotoxique, telles que *Escherichia coli* B2 produisant de la colibactine, une toxine associée au cancer colorectal. Les résultats démontrent que le DON aggrave la génotoxicité des souches d'*E. coli*, avec une augmentation significative des dommages à l'ADN (acide désoxyribonucléique) observée dans les cellules intestinales des animaux exposés simultanément au DON et aux souches d'*E. coli* produisant de la colibactine (Payros et al., 2017).

3.3. Cas des microplastiques

3.3.1. Définition de microplastique

Une matière plastique, également connue sous le nom de polymère, est un matériau synthétique composé de macromolécules formées par l'assemblage de nombreuses unités répétitives appelées monomères. Les plastiques sont fabriqués à partir de ressources pétrolières, principalement des hydrocarbures.

Les plastiques sont largement utilisés dans de nombreux secteurs de l'industrie et de la vie quotidienne en raison de leurs propriétés uniques. Ils sont légers, durables, résistants à l'humidité, et peuvent être moulés et façonnés dans une grande variété de formes et de tailles. Les plastiques sont utilisés dans la fabrication d'emballages, de produits électroniques, de véhicules, de jouets, d'articles ménagers, de textiles, et bien plus encore.

Cependant, l'utilisation répandue des plastiques a également entraîné des préoccupations environnementales majeures. Les plastiques sont des matériaux persistants dans l'environnement et peuvent prendre des centaines d'années à se décomposer. Leur accumulation dans les océans, les sols et les écosystèmes a un impact négatif sur la biodiversité et entraîne des problèmes écologiques (Pedrotti et al., 2022).

D'après une étude réalisée par Geyer et al., la production industrielle de plastiques à grande échelle depuis les années 1950 a abouti à une production mondiale de plus de 8,3 milliards de tonnes de plastiques (Geyer et al., 2017). Seulement 9 % de ces plastiques ont été recyclés, 12 % ont été incinérés, tandis que le reste, soit environ 79 %, s'est accumulé dans des décharges ou a été rejeté dans l'environnement. Selon une autre étude plus récente de PlasticsEurope intitulée "Plastics - the Facts 2022", la production mondiale de plastiques continue d'augmenter, atteignant 390 millions de tonnes en 2021, ce qui représente une augmentation d'environ 6% par rapport à l'année précédente. Les principaux pays producteurs sont la Chine (32%), l'Amérique du Nord (18%) et l'Europe (15%). Cependant, cette étude souligne également une prise de conscience croissante de la nécessité d'une meilleure gestion de la fin de vie des plastiques. En Europe, par exemple, on constate une réduction considérable du stockage des déchets plastiques en décharges (23 %) au profit de leur incinération (42 %) et de leur recyclage (35 %) (Plastics Europe_Plastics - the Facts 2022).

Malgré la prise de conscience croissante de l'impact écologique des plastiques et en raison de leur grande résistance à la dégradation, il est maintenant largement établi que toutes les

composantes de l'environnement sont affectées par la présence de matières plastiques. L'écosystème marin a été le premier et le plus médiatisé, suscitant une profonde préoccupation quant aux conséquences des plastiques sur la vie marine. Les animaux marins tels que les tortues, les oiseaux, les poissons et les mammifères de cet écosystème peuvent ingérer des débris plastiques ou s'y retrouver piégés leur occasionnant des blessures graves, voire la mort. De nombreuses études mettent en évidence une contamination étendue des écosystèmes marins par des débris plastiques, touchant 50 % de toutes les espèces d'oiseaux marins, 66 % de toutes les espèces de mammifères marins et la totalité des espèces de tortues marines (Rochman et al., 2016).

Des recherches supplémentaires ont mis en évidence la présence de plastiques dans différents milieux. Par exemple, une étude menée par Yang et al. en 2021 a identifié la présence de plastiques dans les sols (L. Yang et al., 2021). Habibi et al. ont également constaté une contamination de l'air intérieur et extérieur par des microplastiques (Habibi et al., 2022). Mais, ce qui est particulièrement préoccupant, c'est la présence de plastiques dans notre alimentation. Des études comme celle de Koelmans et al. ont montré que l'eau de boisson peut contenir des microplastiques (Koelmans et al., 2019). De même, Oliveri et al. ont constaté la contamination des fruits et légumes par ce contaminant (Oliveri Conti et al., 2020). Les produits issus de la mer, tels que les poissons et les fruits de mer, ont également été identifiés comme étant contaminés par des microplastiques (Mercogliano et al., 2020). Ces résultats soulignent l'ampleur du problème de la contamination plastique dans notre chaîne alimentaire.

Il est de ce fait, essentiel de comprendre l'origine des matières plastiques qui contaminent notre alimentation, car leur présence répandue dans une grande variété d'aliments est préoccupante. Les matières plastiques se retrouvent principalement sous forme de microplastiques et de nanoplastiques. Les microplastiques sont des particules de plastique de petite taille, généralement inférieure à 5 mm, tandis que les nanoplastiques sont encore plus petits, mesurant moins d'un micromètre.

Plusieurs sources contribuent à la contamination des aliments par les microplastiques. L'une des principales est la fragmentation des plastiques plus grands présents dans l'environnement. Les plastiques se dégradent en morceaux plus petits en raison de l'exposition aux rayons UV du soleil, de l'action mécanique des vagues et du vent, ainsi que de l'action biologique des microorganismes. Ces morceaux de plastique fragmentés, qui

deviennent des microplastiques, se dispersent ensuite dans l'environnement, y compris dans les océans, les rivières et les sols (Andrady, 2017).

Une autre source majeure de microplastiques est liée aux activités humaines. Les activités industrielles, telles que la production et l'utilisation de plastiques, contribuent à la libération de microplastiques dans l'environnement. Par exemple, les résidus de plastiques issus de la fabrication de produits en plastique, les rejets d'usines de traitement des eaux usées et les déchets plastiques mal gérés sont autant de sources de microplastiques qui peuvent contaminer les sols, les rivières et les mers (Wright & Kelly, 2017).

De plus, d'autres sources de microplastiques dans notre alimentation sont liées à l'utilisation quotidienne de produits plastiques. Par exemple, le lavage de textiles synthétiques, tels que les vêtements en polyester, dans les machines à laver peut libérer des microfibrilles plastiques qui se retrouvent ensuite dans les eaux usées. Ces microfibrilles peuvent traverser les stations de traitement des eaux usées et se retrouver dans les cours d'eau, les océans et finalement dans les organismes marins qui constituent notre alimentation (Napper & Thompson, 2020).

3.3.2. Les principaux polymères et leur utilisation

Il existe une grande variété de polymères utilisés dans différents produits et industries :

Le Polyéthylène (PE) : Le PE est un polymère thermoplastique qui se caractérise par sa résistance à l'humidité, aux produits chimiques et à l'usure. Il est largement utilisé dans la fabrication de sacs en plastique, de films d'emballage, de bouteilles en plastique, de contenants alimentaires, de tuyaux et de revêtements. Sa structure chimique est basée sur des unités répétitives d'éthylène.

Le Polypropylène (PP) : Le PP est également un polymère thermoplastique qui offre une résistance élevée à la chaleur, à l'usure et aux produits chimiques. Il est utilisé dans la fabrication de produits jetables tels que les couverts en plastique, les emballages alimentaires, les fibres textiles, les pièces automobiles et les produits médicaux. Sa structure chimique est basée sur des unités répétitives de propylène.

Le Polychlorure de vinyle (PVC) : Le PVC est un polymère thermoplastique qui se distingue par sa résistance aux intempéries, à l'abrasion et aux produits chimiques. Il est utilisé dans la fabrication de tuyaux, de revêtements de sol, de fenêtres, de câbles électriques, de jouets,

de matériaux de construction et d'emballages. Sa structure chimique est basée sur des unités répétitives de chlorure de vinyle.

Le Polystyrène (PS) : Le PS est un polymère thermoplastique qui présente une bonne isolation thermique et électrique. Il est utilisé dans la fabrication de gobelets jetables, de plateaux alimentaires, de matériaux d'isolation, de boîtiers électroniques et de produits de papeterie. Sa structure chimique est basée sur des unités répétitives de styrène.

Le Polyéthylène téréphtalate (PET) : Le PET est un polymère thermoplastique qui offre une bonne résistance à l'humidité, aux produits chimiques et à la déformation. Il est couramment utilisé dans la fabrication de bouteilles en plastique pour les boissons, les fibres textiles, les emballages alimentaires, les films d'emballage et les textiles techniques. Sa structure chimique est basée sur des unités répétitives d'éthylène téréphtalate.

Le Polyuréthane (PU) : Le PU est un polymère thermoplastique élastomère qui présente une grande résistance à l'abrasion, à la flexion et à la déchirure. Il est utilisé dans la fabrication de mousses isolantes, de revêtements de meubles, de revêtements de sol, de pneus, de matériaux d'isolation et de revêtements de surface. Sa structure chimique est basée sur des unités répétitives d'uréthane.

Le Polycarbonate (PC) : Le PC est un polymère thermoplastique transparent qui se distingue par sa résistance aux chocs, à la chaleur et aux rayures. Il est utilisé dans la fabrication de bouteilles réutilisables, de lentilles de lunettes, de matériaux de construction, de composants électroniques et de pièces automobiles. Sa structure chimique est basée sur des unités répétitives de carbonate.

Parmi tous ces polymères, le PE est le plus largement utilisé à travers le monde. Il est prisé pour ses excellentes propriétés physiques et chimiques, notamment sa résistance, sa flexibilité, sa légèreté et sa facilité de transformation. Ces caractéristiques en font un matériau de choix dans de nombreux secteurs industriels, tels que l'emballage, l'automobile, la construction, l'électronique et l'agriculture.

Selon le rapport de PlasticsEurope de 2022, le PE représente la plus grande part de la production mondiale de plastiques. Il est utilisé dans la fabrication de sacs en plastique (notamment les sacs d'épicerie et les sacs de transport), de films d'emballage, de bouteilles en plastique, de contenants alimentaires, de tuyaux et de revêtements (figure 7).

En raison de sa durabilité et de son faible coût de production, le PE est largement utilisé dans les applications à usage unique, mais il est également présent dans de nombreux produits durables. Cela a conduit à une augmentation significative de la demande de PE au fil des années.

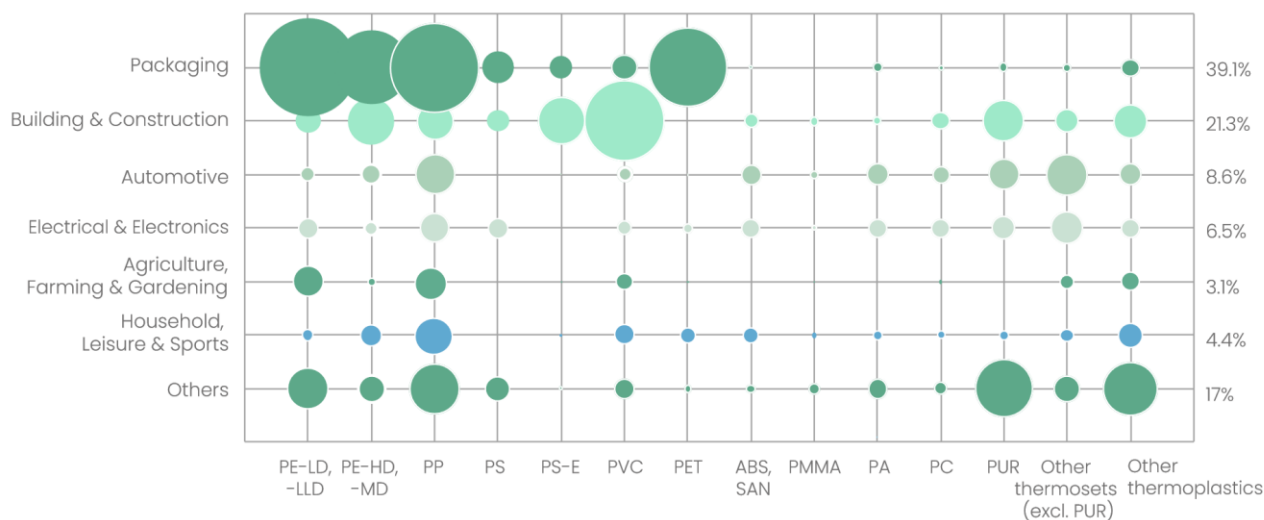


Figure 7 : Répartition de la demande des transformateurs de plastiques européens par application et par type de polymère.

3.3.3. Origines de contamination alimentaire et incidence sur l'exposition humaine

La contamination alimentaire par les microplastiques émane de diverses sources, suscitant une préoccupation croissante pour la santé publique. Parmi les principales sources de contamination, on retrouve la pollution environnementale, les emballages alimentaires en plastique, les procédés de transformation des aliments et même l'eau potable. Par conséquent, notre exposition aux microplastiques se fait à travers une multitude de sources alimentaires :

Via les produits de la mer : Les études sur la contamination des produits de la mer par les microplastiques ont montré des résultats préoccupants. Une étude de Rochman et al. en 2015 a révélé que les microplastiques étaient présents dans 36,5 % des poissons capturés en mer destinés à la consommation humaine (Rochman et al., 2015). Les microplastiques ont été trouvés dans les intestins des poissons ainsi que dans les tissus musculaires, ce qui soulève des inquiétudes quant à leur transfert potentiel dans la chaîne alimentaire. De plus, une analyse menée par Karami et al., a révélé que les microplastiques étaient détectés dans 73 % des échantillons de poissons et de fruits de mer provenant de différents marchés (36 microplastiques par poisson, principalement sous forme de fragments, films et fibres avec

une majorité de PP, PE et PS), confirmant la contamination répandue de ces produits (Karami et al., 2017).

Via les boissons : Selon une étude menée par Koelmans et ses collègues, les microplastiques étaient présents dans 93 % des échantillons d'eau en bouteille analysés (Koelmans et al., 2019). Les chercheurs ont observé la présence de microplastiques de différentes tailles et formes, principalement des fibres synthétiques (1.10^2 à 10^8 particules /m³, avec prédominance de PE et PP mais ils retrouvent aussi du PS, du PVC et du PET). De plus, une étude réalisée par Pivokonsky et al., a également révélé la contamination par des microplastiques de PET et de PE (1-10 µm) dans l'eau du robinet (Pivokonsky et al., 2018). Le PE et le PP sont les polymères plastiques les plus couramment identifiés dans les eaux douces et l'eau du robinet (Hirt and body-Malapel, 2020). Par ailleurs, une analyse effectuée par Shruti et ses collaborateurs en 2020 a détecté la présence de microplastiques dans 84 % des échantillons de boissons gazeuses, de thé glacé et de bière, contenant en moyenne 28 particules/L de PA et de Poly(ester-amide), soulignant ainsi la présence répandue de ces particules dans une grande variété de boissons que nous consommons (Shruti et al., 2020).

Via les fruits et légumes : L'étude menée par Oliveri Conti et al. a cherché à évaluer la présence de microplastiques dans des échantillons de fruits (Oliveri Conti et al., 2020). Les chercheurs ont prélevé des échantillons de différents types de fruits auprès de marchés locaux et de supermarchés. Les résultats de l'étude ont révélé que 41 % des échantillons de fruits analysés étaient contaminés par des microplastiques. Les microplastiques détectés étaient principalement sous forme de fibres et de fragments. Les types de fruits les plus fréquemment contaminés étaient les agrumes, les baies et les fruits à noyau tels que les pêches et les prunes allant jusqu'à 223 000 particules/g de fruits et jusqu'à 97 800 particules/g de légumes (1 à 2.5 µm). Ces résultats indiquent que les fruits peuvent être contaminés par des microplastiques tout au long de leur cycle de production, de leur récolte et de leur conditionnement. Les microplastiques peuvent provenir de diverses sources, notamment l'environnement, l'emballage et les pratiques agricoles.

Via, au final, la majorité des denrées alimentaires : L'utilisation répandue du PE dans les emballages alimentaires, en raison de ses propriétés de préservation et de manipulation aisée pendant le transport et le stockage des aliments, entraîne une migration du PE depuis les emballages vers les produits alimentaires. Cette migration peut se produire en raison de divers facteurs tels que la perméabilité du matériau d'emballage, l'interaction chimique entre

le PE et les composants alimentaires, ainsi que les conditions de stockage et de traitement (Katsara et al., 2021). D'autres études ont montré que les microplastiques étaient présents dans 81 % des échantillons de sel de mer analysés, suggérant une contamination par les eaux marines polluées par les plastiques. De plus, une analyse menée par Lee et al., a montré des microplastiques dans 100 % des échantillons de sel analysés provenant de différentes régions du monde, montrant ainsi une contamination généralisée de cet ingrédient commun (98 à 2395 microplastiques/Kg principalement du PP, du PE et du PET d'une taille comprise entre 63 et 251 μm) (H.-J. Lee et al., 2021).

En raison de la contamination généralisée de l'environnement et des aliments, il est inévitable que l'Homme soit exposé aux microplastiques. Une étude récente a calculé que les taux médians d'absorption de microplastiques étaient de 553 particules par jour par personne pour les enfants et de 883 particules par jour par personne pour les adultes. Cette absorption peut entraîner une accumulation irréversible allant jusqu'à $8,32 \times 10^3$ particules par personne pour les enfants jusqu'à l'âge de 18 ans, et jusqu'à $5,01 \times 10^4$ particules par personne pour les adultes jusqu'à l'âge de 70 ans, dans les tissus corporels pour les particules de 1 à 10 μm (Mohamed Nor et al., 2021). L'étude menée par Senathirajah et al. en 2021 a révélé que les êtres humains ingèreraient en moyenne entre 0,1 et 5 grammes de plastique par semaine. Cette estimation a été obtenue grâce à une analyse approfondie prenant en compte différents paramètres, tels que les caractéristiques des microplastiques et les habitudes de vie de chaque individu (Senathirajah et al., 2021). Même si d'autres études montrent une ingestion de microplastiques du même ordre de grandeur, comprise entre 398 à 431 g/an (Bai et al., 2022), des doutes subsistent quant aux quantités réelles de microplastiques ingérées par l'Homme. C'est ce que tente de démontrer l'étude de Mohamed Nor et al., reprise par Pletz, qui suggère une ingestion bien moindre, avec une moyenne de 4,1 μg /semaine pour un adulte (Mohamed Nor et al., 2021; Pletz, 2022).

Une étude supplémentaire portant sur l'analyse des microplastiques dans trois échantillons de méconium, six échantillons de selles infantiles et dix échantillons de selles d'adultes a conclu que les concentrations de microplastiques étaient significativement plus élevées dans les selles des enfants que dans celles des adultes (PET et PC entre 110 et 12000 ng/g chez le bébé, PET 5700 à 82 000 ng/g et PC 49 à 2100 ng/g chez l'enfant et chez l'adulte <16000 ng/g) (N. Zhang et al., 2021). D'autres études ont également montré la détection de divers types de microplastiques dans les selles d'adultes (en moyenne 20 microplastiques/10 g contenant du PP, du PET, du PS et du PE de 20 à 800 μm) (Schwabl et al., 2019; Luqman et al., 2021; Wibowo et al., 2021).

Il convient de souligner que les microplastiques trouvés dans les selles humaines sont présents dans une large gamme de tailles, allant de 20 à 800 μm . Cela indique que les particules de PE peuvent être ingérées et se déposer dans le tractus intestinal pouvant potentiellement interagir avec les cellules intestinales. De plus, des études récentes ont également révélé la présence de microplastiques de PE dans des échantillons de placenta et de méconium humains. Le placenta est un organe crucial qui nourrit et protège le fœtus pendant la grossesse, tandis que le méconium est la première selle d'un nouveau-né. La détection de microplastiques de PE dans ces échantillons suggère que les fœtus et les nouveau-nés peuvent être exposés aux microplastiques dès la période prénatale. Cela soulève des préoccupations quant à l'impact potentiel des microplastiques sur le développement et la santé intestinale dès les premiers stades de la vie (Braun et al., 2021).

Il est compréhensible que le tube digestif soit l'organe cible des microplastiques en raison de son rôle essentiel dans la digestion et l'absorption des aliments. En tant que premier point de contact avec les aliments contaminés, l'intestin est exposé aux microplastiques présents dans notre alimentation. Une étude récente a même démontré la présence de microplastiques dans la salive humaine, soulignant le rôle passif de la bouche en tant que récepteur de ces particules présentes dans l'air (majoritairement inférieures à 100 μm avec en moyenne 0.33 microplastiques/individu de type PE, PET, PP, PS PVC) (Abbasi & Turner, 2021). De plus, la structure anatomique du tube digestif présente des caractéristiques favorables à l'interaction entre les microplastiques et les tissus intestinaux. Avec sa surface interne étendue et ses replis, l'intestin offre une grande superficie propice à l'adhérence et à l'accumulation des microplastiques. Cette capacité d'interaction a été mise en évidence par les auteurs d'une étude portant sur la présence de microplastiques dans des échantillons de colectomie de patients (en moyenne 28.1 particules/g sous forme de filaments ou de fibres de type PC, PA et PP) (Ibrahim et al., 2021). Ces résultats démontrent que les microplastiques ont la capacité de se fixer et de s'accumuler dans les tissus intestinaux, mettant en évidence l'importance de l'intestin en tant qu'organe cible pour les microplastiques.

Cependant, plusieurs études ont montré que les microplastiques peuvent également être détectés dans d'autres organes du corps humain, ce qui indique leur capacité à se disséminer à travers le corps. Une étude récente a révélé la présence de microplastiques dans le foie, mettant en évidence le passage des microplastiques de l'intestin vers cet organe essentiel de détoxification (en moyenne 4.6 particules/g de taille comprise entre 4 et 30 μm de type PS, PVC et PET) (Horvatits et al., 2022). De plus, une étude menée par

Pironti et al., a démontré qu'une partie des microplastiques était éliminée par les urines (principalement des microplastiques de PVC, de PP et de PE d'une taille allant de 4 à 15 μm), malgré qu'aucune étude n'ait détecté de microplastiques dans les reins humains jusqu'à présent (Kutralam-Muniasamy et al., 2023; Pironti et al., 2022). D'autres recherches ont fourni des preuves convaincantes de la capacité des microplastiques à se propager dans le système sanguin humain. L'étude de Rotchell et al. En 2023 a évalué la contamination par les microplastiques dans des échantillons de tissu veineux humain, identifiant ainsi 20 particules de forme irrégulière et de différents polymères (PVA, résines d'alkyde et du nylon) avec en moyenne 29.28 microplastiques/g de tissu (Rotchell et al., 2023). Ces résultats confirment la capacité des microplastiques à être transportés dans les tissus humains, en particulier les vaisseaux sanguins. Parallèlement, une autre étude menée par Leslie et al. en 2022 a également confirmé la présence de microplastiques (principalement du PET, du PE et du PS à une concentration comprise entre 2 et 7 $\mu\text{g/ml}$) dans des échantillons de sang humain, soulignant ainsi leur capacité à pénétrer dans le système circulatoire (H. A. Leslie et al., 2022). Ces deux études ont aussi mis en évidence la prédominance du polyéthylène parmi les microplastiques détectés.

Il est important de noter que l'exposition humaine aux microplastiques ne se limite pas seulement à l'alimentation. Les microplastiques peuvent également être présents dans l'environnement sous forme de particules en suspension pouvant être inhalés et ingérés par les individus comme le révèle l'étude de Habibi et al. avec la présence de microplastiques dans l'air intérieur et extérieur (Habibi et al., 2022). De plus, des recherches ont démontré la présence de microplastiques dans les tissus pulmonaires (Jenner et al., 2022) et dans des expectorations chez l'Homme (S. Huang et al., 2022), mettant ainsi en évidence leur capacité à pénétrer dans les voies respiratoires de s'y accumuler et pouvant être éliminé dans le tube digestif par le processus de clairance mucociliaire (Wanner et al., 1996). De plus, l'étude de Liu et al. indique que les données sur l'ingestion de microplastiques pourraient être sous-estimées, principalement en raison de l'omission potentielle de l'ingestion de matières plastiques présentes dans l'air, notamment par l'inhalation de poussières. (K. Liu et al., 2024).

Outre l'exposition par voie respiratoire, l'exposition cutanée est également une voie d'exposition possible aux microplastiques. Les produits de soins personnels et cosmétiques, tels que les gommages, les lotions et les maquillages, peuvent contenir des particules de microplastiques qui entrent en contact avec la peau lors de leur utilisation. Des études ont confirmé la présence de microplastiques dans ces produits, ce qui soulève des

préoccupations quant à leur absorption par la peau et leur accumulation dans les tissus sous-jacents (L. Deng et al., 2022).

3.3.4. Etudes toxicologiques *in vivo*

Les recherches récentes sur la biodistribution des microplastiques dans l'organisme ont révélé des découvertes préoccupantes quant à leur capacité de dispersion à travers le corps. Des études menées sur des modèles *in vivo* ont démontré que les microplastiques peuvent se retrouver dans l'ensemble du tractus intestinal, du foie, des reins, des poumons et même du cerveau, mettant ainsi en évidence leur potentiel impact sur divers organes (Choi et al., 2021; Im et al., 2022; Garcia et al., 2023). Toutefois, l'intestin et le foie restent les principaux organes cibles des microplastiques provenant de l'alimentation. L'étude de la toxicité des microplastiques est un domaine de recherche émergent, comme en témoigne l'augmentation récente du nombre de publications répertoriées dans PubMed au cours des vingt dernières années (figure 8). Les premières études explorant la toxicité des microplastiques chez les animaux ont commencé à émerger dans la littérature scientifique dans les années 2010, notamment chez les animaux marins que nous consommons, montrant ainsi leur présence dans la chaîne alimentaire marine et humaine. Cependant, ce n'est qu'à partir de 2016 que des recherches plus approfondies ont commencé à mettre en évidence les effets nocifs des microplastiques chez les mammifères et notamment chez la souris.

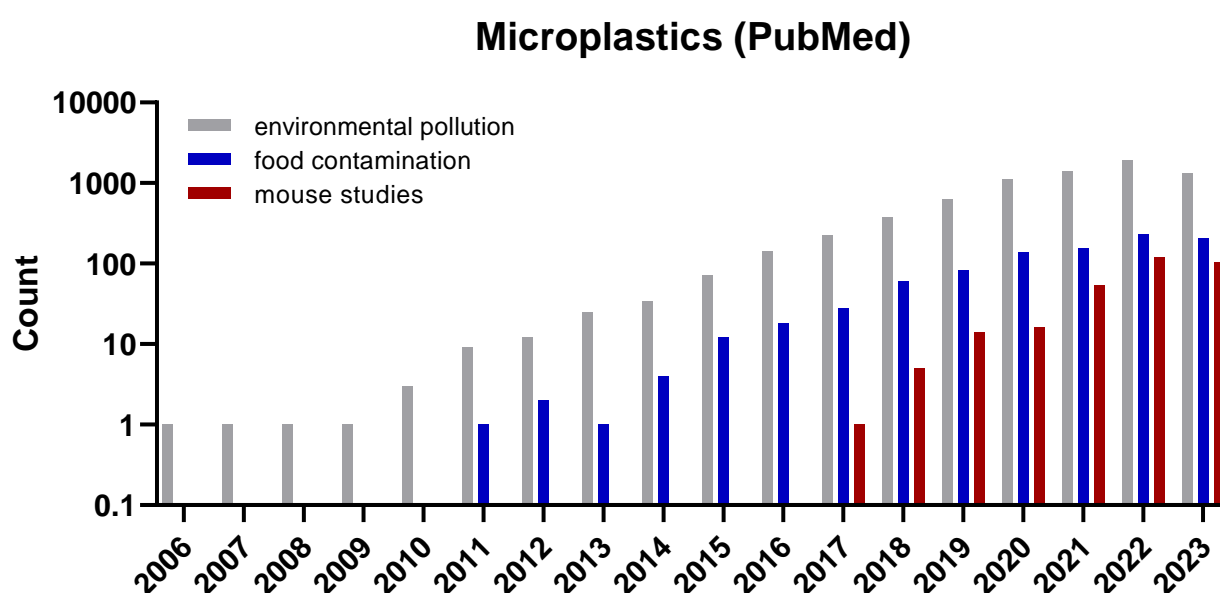


Figure 8 : Évolution du nombre de publications scientifiques référencées dans PubMed sur les microplastiques (juillet 2023).

3.3.4.1. Toxicité au niveau intestinale

L'exposition aux microplastiques peut avoir des conséquences néfastes sur la barrière intestinale, qui joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité de l'intestin et la prévention du passage de substances indésirables dans l'organisme. Des études ont révélé que les microplastiques ont la capacité de perturber la fonction de la barrière intestinale en provoquant des altérations tant sur le plan structurel que fonctionnel.

Une étude récente menée sur des souris a démontré les effets néfastes des microplastiques de PVC sur la paroi intestinale (microplastiques sphériques de 2 µm 100 mg/kg par gavage pendant 60 jours), notamment en réduisant la sécrétion de mucus et en augmentant la perméabilité intestinale (Chen et al., 2022b). De manière similaire, une étude menée par Jia et al., a montré des résultats concordants en exposant les souris à des microplastiques de PP (microplastiques sphériques de 7 et 70 µm aux doses de 0.1, 1 et 10 mg/ml par gavage pendant 28 jours), entraînant une altération de l'organisation des jonctions serrées entre les cellules épithéliales, notamment ZO-1 (Zonula occludens-1), Claudine1 et occludine, induisant une augmentation de la perméabilité intestinale avec des effets plus importants pour les PP de 7 µm (R. Jia et al., 2023). Cette augmentation de la perméabilité intestinale peut permettre le passage de substances potentiellement toxiques, telles que des antigènes alimentaires ou des bactéries, à travers la barrière intestinale, pouvant déclencher une réponse inflammatoire.

Par ailleurs, il a été reporté que l'exposition aux microplastiques peut induire un stress oxydant au niveau de l'intestin. Ce stress oxydant se produit lorsque les niveaux de radicaux libres des espèces réactives de l'oxygène impliquées dans les processus d'oxydation, dépassent la capacité du système de défense antioxydant de l'organisme. Des études ont démontré que les microplastiques de PP peuvent accroître la production de radicaux libres et réduire les niveaux d'antioxydants dans les tissus intestinaux, créant ainsi un déséquilibre entre l'oxydation et l'antioxydation (R. Jia et al., 2023). De manière similaire, une étude menée par Xie et al. en 2022 a obtenu des résultats comparables chez la souris exposée par voie orale à différents types de microplastiques, notamment le PE, le PP, le PS, le PVC et le PET (microplastiques de forme irrégulière et rugueuse, compris entre 150 et 300 µm, administrés par gavage à la dose de 4 mg par souris et par jour pendant 8 jours.) (Xie et al., 2022).

L'exposition aux microplastiques a également été associée à une induction de l'inflammation, généralement en corrélation avec le stress oxydant. Dans une étude menée

par Li et al. en 2020, il a été démontré qu'une intoxication par des microplastiques de PE données dans la nourriture (forme sphérique comprise entre 10 et 150 μm , aux concentrations de 6, 60 et 600 $\mu\text{g}/\text{jour}$, pendant 5 semaines) entraînait une augmentation significative des niveaux d'IL-1 α et d'IL-6 dans le sang, témoignant d'une réponse inflammatoire systémique. De plus, cette étude a révélé une inflammation au niveau de l'intestin grêle, caractérisée par des altérations de la composition cellulaire, notamment une diminution des lymphocytes T auxiliaires de type 17 (Th17) et des Treg dans la muqueuse intestinale (B. Li et al., 2020). Une autre étude réalisée par Sun et al. en 2021, a révélé qu'à de faibles doses de PE (microplastiques de forme sphérique, compris entre 1 et 10 μm administrés par gavage aux doses de 0.002 et 0.2 $\mu\text{g}/\text{g}/\text{jour}$ pendant 30 jours.), il y avait une augmentation des niveaux d'IL-8 et d'IL-10 dans le côlon, soulignant ainsi l'implication de l'inflammation dans la réponse intestinale aux microplastiques (H. Sun et al., 2021). Enfin, il a été montré qu'une exposition aux microplastiques de PS (forme sphérique de 1 μm , administrée à la dose de 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/jour dans l'eau de boisson.) induit une signature inflammatoire dans les intestins des souris, caractérisée par des marqueurs d'inflammation tels que HMGB1 oxydé (high mobility group box 1), TGF- β 1 (Transforming Growth Factor Beta 1) et l'activation des lymphocytes T et des cellules NKT (Rawle et al., 2022).

De plus, la présence de fragments de plastiques a été associée à une susceptibilité accrue à l'inflammation dans certains modèles murins, selon plusieurs études. Par exemple, He et al. en 2022 ont démontré que les nanoplastiques de PS (forme sphérique de 100 nm, administrée par injection intrapéritonéale à la dose de 5 et 20 $\mu\text{g}/\text{g}/\text{jour}$ pendant 2 semaines) sont capables d'aggraver l'inflammation induite par le lipopolysaccharide (LPS) et d'augmenter la perméabilité dans le duodénum des souris en utilisant la voie ROS-NF- κB /NLRP3 suggérant que la petite taille des fragments de polystyrène peut faciliter leur pénétration dans les tissus et les barrières biologiques, augmentant ainsi considérablement leur potentiel à déclencher des effets toxiques, notamment au niveau intestinal. (He et al., 2022). Dans une étude supplémentaire menée par Luo et al. en 2022, il a été constaté que l'exposition aux microplastiques de PS (forme sphérique de 5 μm , administrée aux doses de 0.5 et 5 μg par souris par gavage pendant 21 jours.) aggravait la colite induite par le dextran sulfate de sodium (DSS) en altérant la fonction protectrice de la barrière intestinale. Cette altération se manifestait par une réduction de la sécrétion de mucus et de l'expression des protéines de jonction serrée (claudine 1 et occludine), ainsi qu'une augmentation de l'expression de marqueurs associés au stress oxydant (cyclooxygénase 2 COX2) et à l'inflammation (IL17a et IL22) (T. Luo et al., 2022).

Enfin, plusieurs études ont montré l'impact des microplastiques sur la flore bactérienne intestinale. L'étude de Li et al., a notamment mis en évidence les effets de l'ingestion de microplastique de PE (forme sphérique comprise entre 10 et 150 μm , aux concentrations de 6, 60 et 600 $\mu\text{g}/\text{jour}$, pendant 5 semaines) sur la composition et la fonction de cette flore (B. Li et al., 2020). Les souris exposées à des concentrations élevées de microplastiques de PE ont montré une augmentation significative de l'abondance bactérienne et de la diversité de la flore par rapport au groupe témoin. Ces modifications, telles que la diminution des *Bacteroidetes* et l'augmentation des *Firmicutes* et *Melainabacteria*, peuvent contribuer à l'inflammation intestinale et à d'autres troubles associés. Une autre étude menée par Jin et al. en 2019 a également constaté une altération de la composition microbienne au niveau du phylum et du genre bactérien suite à l'ingestion de microplastiques de PS (forme sphérique de 5 μm , administrée à la dose de 1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ dans l'eau de boisson pendant 6 semaines) (Y. Jin et al., 2019).

Certaines bactéries présentes dans l'intestin produisent des AGCC tels que le butyrate et l'acide acétique, qui ont des effets anti-inflammatoires et régulent le métabolisme énergétique. L'exposition aux microplastiques de PVC semble réduire la présence de bactéries productrices de butyrate, telles que *Faecalibacterium*, tandis que d'autres bactéries comme *Lachnoclostridium* et *Alloprevotella* voit leur abondance augmenter. Ces micro-organismes intestinaux sont également impliqués dans la production d'acide acétique et sont liés à des processus tels que la perméabilité intestinale accrue, l'inflammation et la production d'acides gras à chaîne courte. De plus, le microbiote intestinal contribue à l'apport en vitamines, et l'exposition aux microplastiques de PVC (forme sphérique de 2 μm , administrée à la dose de 0.5 mg/jour par gavage pendant 60 jours.) semble influencer la digestion et l'absorption des vitamines chez les souris adultes (Chen et al., 2022b). Ces découvertes soulignent l'importance de mieux comprendre l'impact du microbiote intestinal sur l'écosystème intestinal et l'organisme dans son ensemble.

3.3.4.2. Toxicité au niveau hépatique

Les microplastiques ont été associés à des effets toxiques au niveau hépatique, similaires à ceux observés au niveau intestinal. Des études ont démontré que ces particules de plastique peuvent causer des dommages et des altérations au foie chez les animaux, notamment les souris et les rats. Par exemple, les microplastiques de PVC (forme sphérique de 5 μm , administrée à la dose de 1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ dans l'eau de boisson pendant 6 semaines) ont été liés à une augmentation des marqueurs sériques tels que l'aspartate aminotransferase (AST) et l'alanine aminotransferase (ALT), ainsi qu'à des modifications de

la structure des hépatocytes et des mitochondries (Chen et al., 2022a) témoignant ainsi d'une souffrance hépatique. De plus, les microplastiques de PS (formes sphériques de 0.5 et 5 μm , administrées à la dose de 10 mg/L dans l'eau de boisson pendant 3 mois) perturbent l'équilibre du mécanisme de régulation du stress oxydant en réduisant l'activité des enzymes antioxydantes telles que SOD (superoxyde dismutase), CAT (catalase) et GSH (glutathion), et influencent la voie SIRT3/SOD2 qui joue un rôle important dans l'élimination des ROS qui sont associées aux lésions cellulaires (Zou et al., 2023).

Une autre étude a révélé que les microplastiques de PS (forme sphérique de 1 à 10 μm et de 50 à 100 μm , administrée à la dose de 10 mg/L dans l'eau de boisson pendant 30 jours) provoquent des lésions fibrotiques au niveau du foie, en activant les macrophages et en favorisant la formation de pièges extracellulaires de macrophages (macrophage extracellular traps). Cette activation des macrophages conduit à une réponse inflammatoire et à une transition épithélio-mésenchymateuse dommageable pour le foie, par l'intermédiaire de la voie de signalisation ROS/TGF- β /Smad2/3 (S. Wang et al., 2023). De même, une exposition aux nanoplastiques de PS (forme sphérique de 500 nm, administrée aux doses de 5, 25, 50 et 100 mg/kg par gavage pendant 2 semaines) a été associée à une augmentation importante de marqueurs inflammatoires tels que l'IL-1a, le NF-Kb, le TNFa et l'IL6 (Choi et al., 2021).

Les microplastiques, notamment ceux en PS (formes sphériques de 0.5 et 50 μm , administrées aux doses de 100 et 1000 $\mu\text{g/L}$ dans l'eau de boisson pendant 5 semaines), ont aussi été associés à des altérations du métabolisme lipidique du foie. Des études ont montré que les niveaux de triglycérides (TG) ont diminué dans le foie des souris exposées à ces microplastiques, accompagnés d'une réduction significative des gènes impliqués dans la synthèse des lipides tels que PPAR γ (Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma), Gpat (Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase 3), Dgat1 et Dgat2 (Diacylglycerol O-Acyltransferase) (Lu et al., 2018). D'autres études ont quant à elles révélé une réponse physiologique non unidirectionnelle aux différentes concentrations de microplastiques de PS (forme sphérique de 5 μm , administrée aux doses de 0.001, 0.1, 1 et 10 $\mu\text{g/ml}$ dans l'eau de boisson pendant 10 semaines). Les souris exposées à des concentrations élevées ont perdu du poids de manière significative, tandis que celles exposées à des concentrations plus faibles ont montré peu de changement, voire une prise de poids. De plus, le séquençage du transcriptome a révélé une augmentation de la synthèse des acides gras chez les souris exposées aux faibles doses de microplastiques et ayant pris du poids (H. Huang et al., 2023). Une étude récente menée par Wang et al. en 2022 confirme que les

microplastiques de PS (forme sphérique de 1 µm, administrée aux doses de 100 et 1000 µg/ml dans l'eau de boisson pendant 8 semaines) entraînent une perturbation du métabolisme hépatique, se manifestant par une accumulation de lipides et une altération de la tolérance au glucose. L'analyse lipidomique a révélé des modifications significatives dans les espèces lipidiques du foie, notamment les acides gras libres et les triacylglycérols. De plus, les profils transcriptionnels ont mis en évidence une surexpression de gènes liés au métabolisme lipidique (Q. Wang et al., 2022).

D'autres études ont examiné l'effet des microplastiques dans des conditions de pathologies chroniques et ont observé une sensibilité accrue à l'exposition aux microplastiques chez ces souris. L'étude de Zheng et al en 2021, a révélé que les souris souffrant de colite et exposées aux microplastiques de PS (forme sphérique de 5 µm, administrée à la dose de 500 µg/L dans l'eau de boisson pendant 28 jours.) présentaient une inflammation plus prononcée, une différenciation accrue des adipocytes et des troubles métaboliques hépatiques (H. Zheng et al., 2021). De même, dans une étude menée par Liu et al. en 2022, il a été constaté que les souris diabétiques exposées aux microplastiques de PS (forme sphérique de 300 nm, administrée à la dose de 10 mg/kg par gavage pendant 7 jours) présentaient des lésions hépatiques accentuées, une surexpression de marqueurs inflammatoires et une amplification des perturbations du métabolisme lipidique chez ces souris (S. Liu et al., 2022). Enfin, l'étude menée par Okamura et al. en 2023 a révélé que les souris nourries avec un régime riche en graisses associé à une contamination de l'eau de boisson par des microplastiques de PS (forme sphérique d'une taille comprise entre 450 et 530 nm, administrée à la dose de 1000 µg/L pendant 4 semaines) ont subi des effets néfastes sur leur foie. Ces souris ont présenté une augmentation de la glycémie, des concentrations lipidiques sériques et des scores d'activité de la NAFLD. De plus, l'exposition aux microplastiques a entraîné des dommages tissulaires hépatiques, des troubles métaboliques lipidiques anormaux et une augmentation de l'inflammation hépatique (Okamura et al., 2023).

3.3.5. Quelques études sur modèles *in vitro* humains.

À l'heure actuelle, la littérature scientifique présente peu de données concernant la toxicité des microplastiques sur les modèles cellulaires humains. Cependant, ces dernières années, un nombre croissant d'études ont émergé mettant en évidence leur potentiel toxique chez l'Homme. Parmi les polymères étudiés, le polystyrène occupe une place prépondérante. Ces études se sont principalement focalisées sur l'utilisation de lignées cellulaires épithéliales humaines, reconnues comme des modèles pertinents pour représenter les

tissus épithéliaux présents dans divers organes. Par ailleurs, des investigations ont également été menées sur des cellules immunitaires primaires, jouant un rôle crucial dans la réponse immunitaire et la régulation de multiples fonctions cellulaires.

3.3.5.1. Sur cellules épithéliales

Au niveau intestinal : Différentes études ont démontré que les cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2 sont capables de capturer les microplastiques de polystyrène de différentes formes et tailles (forme sphérique de 0.2 et 200 μm fonctionnalisés en surface avec des acides carboxyliques, aux doses de 10 et 100 $\mu\text{g/ml}$ pendant 5 jours), ce qui entraîne des altérations dans l'expression des gènes liés au stress oxydant tels que HMOX1 (Heme Oxygenase 1), CAT et GPX1 (Glutathione Peroxidase 1) (Saenen et al., 2023). De plus, dans la lignée cellulaire colorectale humaine HRT-18, l'exposition aux microplastiques de polystyrène (forme sphérique d'une taille comprise entre 4.8 et 5.8 μm à la dose de 1 mg/ml pendant 6, 24, 48 heures) a été associée à une augmentation de la cytotoxicité et de l'excrétion de l'IL-8 (Mattioda et al., 2023). Une étude portant sur des cellules intestinales humaines normales (CCD-18Co) a également montré que les microplastiques et nanoplastiques de PS (forme sphérique de 0.5 et 2 μm aux doses de 1, 5, 10 et 20 $\mu\text{g/ml}$ pendant 48h) étaient internalisés par les cellules, induisant des changements métaboliques caractérisés par un stress oxydant accru, une augmentation de la glycolyse et une régulation du métabolisme de la glutamine. Ces modifications métaboliques sont similaires à celles observées lors de l'exposition à l'agent cancérigène azoxyméthane et chez les cellules cancéreuses du côlon HCT15, suggérant ainsi que l'exposition chronique aux microplastiques et nanoplastiques pourrait constituer un facteur de risque de cancer colorectal chez l'Homme (Bonanomi et al., 2022).

Au niveau hépatique : Des études ont été réalisées sur les cellules épithéliales du carcinome hépatocellulaire humain (HepG2) pour évaluer les effets des nanoplastiques de PS. Ces études ont révélé des dommages mitochondriaux, tels qu'une diminution de l'ATP, une augmentation de la fission mitochondriale et une perte de potentiel de membrane mitochondriale accrue. De plus, en présence de nanoplastiques de PS (forme sphérique de 20 nm à la dose de 50 $\mu\text{g/ml}$ pendant 24h), une augmentation de l'expression des protéines caspase 3, caspase 9, cytochrome c et Bax a été observée, tandis que l'expression de la protéine Bcl-2 a diminué, soulignant le caractère pro-apoptotique de ces nanoplastiques (Y. Li et al., 2023). Une étude menée par Banerjee et al. en 2022 sur les cellules HepG2 a également montré des résultats similaires, associant l'exposition aux nanoplastiques de PS (forme sphérique de 50, 100 et 1000 nm aux doses de 10 et 100 $\mu\text{g/ml}$ pendant 4 et 24h) à

une inflammation, notamment par l'augmentation de la sécrétion de l'IL-8 (Banerjee et al., 2022).

D'autres études ont examiné les effets toxiques des microplastiques de PS (forme sphérique de 0.1 et 1 μm à la dose de 1 mg/ml pendant 24h) sur des lignées hépatocytaires non cancéreuses telles que les HL-7702 ou les LO2, révélant des résultats similaires à ceux obtenus avec les HepG2 (Shen et al., 2022). Ces études ont également mis en évidence la relation complexe entre la surcharge de calcium (Ca^{2+}) et la voie de régulation des ROS après la stimulation par les microplastiques de PS. Les résultats suggèrent que la production excessive de ROS et la régulation de la signalisation AMPK-PGC-1 α contribuent à la surcharge de Ca^{2+} (S. Li et al., 2021).

3.3.5.2. Sur cellules immunitaires

Une étude a examiné les effets biologiques de nanoplastiques de différentes tailles de PS (forme sphérique de 50, 200 et 500 nm à la dose de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pendant 24 heures) sur trois types de lignées cellulaires hématopoïétiques humaines différentes : les cellules Raji-B, les cellules THP-1 et les cellules TK6. Les cellules Raji-B sont des lymphocytes de lymphome de Burkitt, les cellules THP-1 sont des monocytes/macrophages dérivés de la leucémie monocytique aiguë, et les cellules TK6 sont des lymphoblastes humains. Les résultats ont révélé l'absence de toxicité des nanoplastiques de PS dans ces types cellulaires. Cependant, une importante internalisation des nanoplastiques a été observée dans les cellules Raji-B et THP-1 par rapport aux cellules TK6. De plus, la quantité de nanoplastiques capturés était inversement liée à leur taille dans les cellules Raji-B et THP-1. Des effets dose-dépendants sur le potentiel de membrane mitochondriale ont été observés dans les cellules Raji-B et THP-1, mais pas dans les cellules TK6. Ces effets étaient présents quelle que soit la taille des nanoparticules. En revanche, aucune conclusion claire n'a pu être tirée concernant l'induction du stress oxydant. Ainsi, les effets toxiques des nanoplastiques de PS varient en fonction de la taille, du type de cellule et du critère biologique étudié (Tavakolpournegari et al., 2023).

De plus, une autre étude a examiné les effets cytotoxiques et génotoxiques des nanoplastiques de PS sur les lymphocytes périphériques humains (forme sphérique de 50 nm aux doses de 500, 1000 et 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pendant 48 heures). Les résultats ont mis en évidence plusieurs conséquences néfastes suite à cette exposition, notamment une activité hémolytique, une diminution de la viabilité cellulaire, une augmentation des aberrations chromosomiques et la formation de micronoyaux. Ces résultats indiquent une cytotoxicité,

des dommages à l'ADN et des instabilités génomiques causés par le stress oxydant induit par les nanoplastiques de PS. Ainsi, cette étude souligne les effets néfastes de ces nanoplastiques sur les lymphocytes périphériques humains (Sarma et al., 2022). Par ailleurs, il convient également de noter que Çobanoğlu et al. en 2021 ont observé des effets similaires avec des microplastiques de PE (forme sphérique d'une taille comprise entre 10 et 45 nm aux doses de 25, 50, 100, 250 et 500 µg/ml pendant 24 heures) (Çobanoğlu et al., 2021).

Enfin, une étude s'est intéressée aux effets toxiques des nanoplastiques de PS (forme sphérique de 80 nm à la dose de 0.1 mg/ml pendant 24 heures) sur les cellules souches/progénitrices hématopoïétiques humaines CD34⁺. Les résultats montrent que ces nanoplastiques réduisent la viabilité cellulaire, endommagent la membrane cellulaire et inhibent la prolifération et la différenciation des cellules souches/progénitrices hématopoïétiques. De plus, les nanoplastiques de PS perturbent le métabolisme cellulaire, en particulier la voie métabolique du cycle de l'acide citrique (Guo et al., 2023).

Ces études soulignent les impacts néfastes des nanoplastiques et des microplastiques sur divers types de cellules, notamment les hépatocytes, les cellules épithéliales intestinales et les lymphocytes périphériques. Les mécanismes sous-jacents comprennent des altérations mitochondriales, une régulation déséquilibrée des protéines impliquées dans l'apoptose, des réponses inflammatoires, des perturbations métaboliques. Il est donc crucial de mieux comprendre ces effets toxiques pour développer des stratégies de prévention et d'atténuation des risques associés à la contamination par les nanoplastiques et les microplastiques dans l'environnement et la santé humaine.

3.3.5.3. Sur le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal, jouant un rôle clé dans l'équilibre intestinal, subit également l'influence des microplastiques. Plusieurs études ont révélé que les animaux exposés à ces particules présentaient des déséquilibres dans leur flore bactérienne, caractérisés notamment par une diminution des bactéries bénéfiques au profit de bactéries connues pour leur caractère pro-inflammatoire. Une question émerge : les microplastiques induisent-ils directement ces modifications bactériennes ou en sont-ils la conséquence secondaire ? Malgré cela, peu d'études se sont jusqu'à présent penchées sur l'impact direct de ces microplastiques sur le microbiote intestinal humain.

Une première étude a démontré l'impact direct des microplastiques de PE (forme sphérique d'une taille comprise entre 30 et 140 μm à la dose de 1000 mg/L pendant 48 heures) sur le microbiote intestinal humain en utilisant un modèle de culture à partir de selles de donneurs sains. Bien que les conditions de culture ne reproduisent pas complètement la physiologie intestinale, les chercheurs ont remarqué une réduction significative des probiotiques tels que *Lactobacillus*, tandis que des pathogènes opportunistes tels qu'*Escherichia* ont proliféré. En outre, les microplastiques de PE ont perturbé les voies métaboliques bactériennes comme la voie des pentoses phosphates, du métabolisme du fructose et du mannose, ainsi que de la biosynthèse des acides biliaires secondaires. Malgré les limites de la méthodologie de culture, ces modifications majeures du microbiote intestinal montrent que le microbiote humain semble être directement impacté par les microplastiques de PE (W. Huang et al., 2021).

Afin de se rapprocher des conditions physiologiques intestinales humaines, des équipes de recherche ont opté pour des systèmes de culture en bioréacteur pour étudier l'impact des microplastiques sur la flore humaine. Une étude menée par Tamargo et al. sur le modèle SIMGI (SIMulator Gastro-Intestinal) a dévoilé les effets néfastes des microplastiques de PET (forme irrégulière de 160 μm à la dose d'environ 0.7 g/jour pendant 72 heures) sur le microbiote colique, engendrant des modifications notables dans la composition et la diversité des communautés microbiennes. Ces altérations se traduisent par une diminution des niveaux de *Bacteroidetes*, qui jouent un rôle crucial dans le microbiote intestinal, et une augmentation des proportions de *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Desulfobacterota* et *Synergistetes*, des groupes microbiens souvent liés à des déséquilibres du microbiote et à des conditions pathologiques (Tamargo et al., 2022).

Dans un modèle innovant intégrant un compartiment luminal, une composante muqueuse (modèle M-ARCOL : Mucosal Artificial Colon) et associé à des tests de toxicité sur un modèle *in vitro* de barrière intestinale (modèle Caco-2/HT29-MTX), les chercheurs ont mis en évidence que les microplastiques de PE (forme sphérique d'une taille comprise entre 1 et 10 μm à la dose de 21 mg/jour pendant 14 jours) favorisent le développement de certains pathobiontes humains, tels que *Desulfovibrionaceae* et *Enterobacteriaceae*, à la fois au niveau luminal et muqueux, au détriment de bactéries bénéfiques, notamment *Christensenellaceae* et *Akkermansiaceae*, uniquement au niveau muqueux. Ces modifications de la composition bactérienne n'ont pas entraîné de différence dans la production de gaz ni de métabolites microbiens et n'ont pas affecté négativement la barrière intestinale *in vitro* (Fournier, Leveque, et al., 2022). Par ailleurs, ces mêmes chercheurs ont

montré que les microplastiques de PE (forme sphérique d'une taille comprise entre 1 et 10 µm à la dose de 21 mg/jour pendant 14 jours) ont un impact plus marqué sur le microbiote dit « immature » d'enfants âgés entre 20 et 30 mois dans le modèle Toddler mucosal Artificial Colon (Tm-ARCOL). Les résultats ont mis en évidence une augmentation de la diversité bactérienne ainsi qu'une présence accrue de bactéries potentiellement nuisibles, telles que les *Dethiosulfovibrionaceae* et les *Enterobacteriaceae*. Ces changements dans la composition du microbiote étaient associés à une réduction de la production de butyrate, un acide gras à chaîne courte bénéfique pour la santé intestinale. De plus, des altérations significatives ont été observées dans les profils des composés organiques volatils (Fournier, Ratel, et al., 2022).

Ces différentes études suggèrent que les microplastiques ingérés peuvent avoir un impact direct sur la composition et les fonctions métaboliques microbiennes, pouvant ainsi entraîner des effets néfastes sur l'homéostasie intestinale chez l'Homme.

Objectifs de la thèse

Au fil des décennies, notre alimentation moderne a subi une évolution considérable, avec l'introduction de nombreux contaminants qui peuvent avoir des effets néfastes sur notre santé. Les contaminants alimentaires peuvent provenir de diverses sources, tels que les résidus de pesticides, les additifs alimentaires, les toxines microbiennes, les métaux lourds et les polluants environnementaux. Ces substances indésirables peuvent se retrouver dans nos aliments à différentes étapes de la chaîne alimentaire, depuis la production agricole jusqu'à la transformation, la distribution et la préparation des aliments.

L'augmentation de la présence de contaminants dans notre alimentation est préoccupante, car elle expose les consommateurs à des risques potentiels pour la santé. Les effets de ces contaminants peuvent être variés, allant des troubles gastro-intestinaux, aux maladies chroniques, en passant par les réactions allergiques et les perturbations hormonales.

L'objectif de cette thèse consiste à étudier l'impact des contaminants alimentaires sur l'intestin et le foie. La thèse sera structurée en plusieurs chapitres distincts, abordant différentes dimensions de cette problématique, et sera présentée sous la forme d'une thèse sur articles.

La première étude se concentrera sur la mycotoxine déoxynivalénol et son impact sur l'intestin en condition pathologiques sur des modèles murins. Bien que la réglementation européenne établisse des teneurs limites de ce contaminant alimentaire, visant à ce que l'exposition chez l'Homme ne dépasse pas la DJT de 1 µg/kg pc/jour, l'EFSA a démontré que certains consommateurs la dépassent et en particulier les plus jeunes. De plus, des études toxicologiques chez l'animal suggèrent que la DJT établie à partir de la NOAEL de 100 µg/kg pc/jour pourrait être surestimée.

Nous avons, nous-même, précédemment identifié que l'exposition au déoxynivalénol à une dose de 10 µg/kg pc/jour, soit 10 fois inférieure à la NOAEL, était également associée à des effets délétères au niveau intestinal. Plus spécifiquement, dans l'intestin grêle, nous avons observé une modulation de la réponse immunitaire et inflammatoire, caractérisée par une diminution des cellules dendritiques dans les ganglions mésentériques et une régulation à la baisse de plusieurs cytokines et chimiokines, dont l'IL1 β , Ccl1 et Cxcl1. Au niveau du côlon, nos résultats ont révélé une hyperplasie de la muqueuse associée à une augmentation de la prolifération et de la différenciation cellulaire, accompagnée d'une inflammation marquée, notamment par une augmentation de l'activité myéloperoxydase. De plus, plusieurs études, dont la nôtre, ont souligné l'impact significatif du DON sur le microbiote intestinal, un élément clé dans le maintien de l'homéostasie.

Ces observations, conjuguées à un manque d'études sur l'impact du déoxynivalénol dans des contextes pathologiques, ont motivé la réalisation d'une étude. Dans un premier temps, l'objectif était d'examiner les effets du DON sur un modèle d'inflammation intestinale induite par l'indométhacine. Dans un second temps, l'attention s'est portée sur le cancer colorectal associé à la colite induite par l'azoxyméthane et le dextran sulfate de sodium. L'objectif principal était d'analyser en détail les impacts du déoxynivalénol sur l'initiation et la progression de ce type de cancer, mettant en évidence une potentielle implication de la flore bactérienne dans l'aggravation des lésions coliques (Article 1).

La deuxième étude se concentrera sur l'impact des microplastiques sur la santé digestive, l'un des contaminants anthropiques émergents de ces dernières années. Une attention particulière sera portée sur le polyéthylène, un polymère fréquemment présent dans notre alimentation et détecté chez l'Homme, notamment au niveau des selles. À ce jour, des inquiétudes croissantes concernant la présence généralisée de ce contaminant, associées à un manque d'études toxicologiques, nous ont conduits à analyser l'impact des microplastiques de polyéthylène sur leur première cible, la sphère digestive.

En tenant compte des études récentes indiquant que l'Homme pourrait ingérer entre 0.1 et 5 g de microplastiques par semaine, soit une dose journalière comprise entre 0.2 et 10.2 mg/kg pc/jour, et que la taille des microplastiques retrouvée dans les selles humaines était comprise entre 20 et 800 μm , nous avons exposé des souris à des microplastiques de polyéthylène de 36 et 116 μm à la dose de 16 mg/kg pc/jour, prenant en compte le facteur d'incertitude toxicologique. Cette étude nous a permis d'évaluer l'impact toxicologique sur les principales fonctions physiologiques au niveau intestinal (article 2) et hépatique (article 3).

En somme, cette thèse vise à approfondir notre compréhension de l'impact des contaminants alimentaires au niveau intestinal et hépatique. L'étude du déoxynivalénol sur des modèles de pathologie intestinale et de cancer colorectal, ainsi que l'étude des microplastiques de polyéthylène sur l'homéostasie intestinale et le foie, en conditions saines et pathologiques, permettra d'apporter des éclairages importants sur les mécanismes impliqués et les conséquences sur la santé. Ces résultats contribueront à renforcer les connaissances en matière de sécurité sanitaire et à orienter les mesures de prévention et de gestion des risques liés aux contaminants alimentaires.

Chapitre 2 : Une contamination alimentaire à faible dose par la mycotoxine déoxynivalénol exacerbe l'entérite et le cancer colorectal chez la souris.

1. Résumé de l'article 1

La mycotoxine déoxynivalénol est un contaminant fréquent des céréales et des produits céréaliers dans le monde entier. L'exposition au DON peut provoquer une inflammation gastro-intestinale, perturber la fonction barrière de l'intestin et induire une dysbiose intestinale *in vivo* dans des conditions basales. Cependant, les effets de l'ingestion du DON chez les personnes atteintes de maladies gastro-intestinales préexistantes sont peu connus.

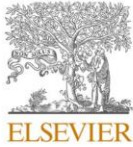
Dans cette étude, des souris ont été exposées par voie orale à des concentrations de DON de 10 et 100 µg/kg de poids corporel par jour, correspondant à des concentrations de consommation quotidienne tolérables chez l'Homme de 10 à 100 fois supérieures, ainsi qu'à l'équivalent de la consommation quotidienne humaine actuelle chez les souris. Les effets de l'exposition au DON ont été étudiés dans des conditions basales, ainsi que dans des modèles murins d'entérite et de cancer colorectal.

Après 8 jours d'exposition au DON, une augmentation des paramètres histomorphologiques et moléculaires de la prolifération épithéliale a été observée chez les souris en conditions basales, allant du duodénum au côlon. Cette même exposition dans un modèle murin d'entérite induite par l'indométacine a entraîné une exacerbation du développement des lésions et l'induction de cytokines iléales. De plus, l'exposition au DON a exacerbé le développement du cancer colorectal associé à la colite chez les souris, comme en témoignent les scores endoscopiques et histologiques de la colite, les grades des tumeurs et l'hyperplasie histologique. Dans le côlon des souris exposées au DON, les gènes de signalisation en amont et en aval de la voie ERK ont été surexprimés, notamment Mapk1, Mapk3, Map 2k1, Map2k2, qui sont les effecteurs clés de la voie ERK, ainsi que les gènes antiapoptotiques Bcl2 et Bcl2l1. Les effets observés dans le modèle de CCR étaient associés à des altérations de la composition taxonomique du microbiote caecal et du métabolisme du fucose et du rhamnose bactériens. Des corrélations fortes de Spearman ont été mises en évidence entre l'abondance relative des genres bactériens modifiés et les variables liées au CCR.

En conclusion, l'ingestion de la mycotoxine DON à des concentrations représentatives de l'exposition humaine a aggravé le développement de l'entérite induite par l'indométacine et du cancer colorectal associé à la colite chez les souris. Ces résultats suggèrent que même à faibles doses, actuellement tolérées dans l'alimentation humaine, le DON pourrait favoriser le développement de maladies intestinales.

2. Article 1

Science of the Total Environment 900 (2023) 165722



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



Low dose dietary contamination with deoxynivalenol mycotoxin exacerbates enteritis and colorectal cancer in mice

Madjid Djouina^a, Christophe Waxin^a, Ségolène Caboche^b, Karine Lecointe^c, Alexander Steimle^d, Delphine Beury^b, Mahesh S. Desai^d, David Hot^b, Laurent Dubuquoy^a, David Launay^a, Cécile Vignal^a, Mathilde Body-Malapel^{a,*}

^a Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286- INFINITE - Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille, France

^b Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US41-UAR 2014-PLBS, F-59000 Lille, France

^c Inserm U1285, Univ. Lille, CHU de Lille, UMR CNRS 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, 59000 Lille, France

^d Department of Infection and Immunity, Luxembourg Institute of Health, Esch-sur-Alzette, Luxembourg

ARTICLE INFO

Editor: Lidia Minguéz Alarcon

Keywords:

Deoxynivalenol
Mycotoxin
Enteritis
Colorectal cancer
Tumorigenesis
Microbiota

ABSTRACT

Background: The mycotoxin deoxynivalenol (DON) is a frequent contaminant of grain and cereal products worldwide. Exposure to DON can cause gastrointestinal inflammation, disturb gut barrier function, and induce gut dysbiosis *in vivo* under basal conditions, but little is known about the effects of DON ingestion in individuals with pre-existing gastrointestinal disease.

Objectives: Mice were orally exposed to 10 and 100 µg/kg bw/day of DON, corresponding to 10 to 100-fold human tolerable daily intake concentrations, and to the translation in mice of current human daily intake. The effects of DON exposure were explored under steady-state conditions, and in murine models of enteritis and colorectal cancer (CRC).

Results: After 8 days of DON exposure, an increase of histomorphological and molecular parameters of epithelial proliferation were observed in normal mice, from the duodenum to the colon. The same exposure in a murine model of indomethacin-induced enteritis led to exacerbation of lesion development and induction of ileal cytokines. DON exposure also worsened the development of colitis-associated CRC in mice as shown by increases in endoscopic and histological colitis scores, tumor grades, and histological hyperplasia. In colon of DON-exposed mice, upstream and downstream ERK signaling genes were upregulated including Mapk1, Mapk3, Map 2k1, Map2k2 core ERK pathway effectors, and Bcl2 and Bcl2l1 antiapoptotic genes. The effects observed in the CRC model were associated with alterations in cecal microbiota taxonomic composition and metabolism of bacterial fucose and rhamnose. Strong Spearman's correlations were revealed between the relative abundance of the changed bacterial genera and CRC-related variables.

Discussion: Ingestion of DON mycotoxin at concentrations representative of human real-world exposure worsened the development of indomethacin-induced enteritis and colitis-associated CRC in mice. Our results suggest that even at low doses, which are currently tolerated in the human diet, DON could promote the development of intestinal inflammatory diseases and CRC.

1. Introduction

Mycotoxins are naturally occurring secondary metabolites produced by fungi. They cause a variety of adverse health effects for both humans and livestock, ranging from acute poisoning to long-term effects such as immune or reproductive deficiencies and cancer (De Ruyck et al., 2015;

Liao et al., 2018; Yang et al., 2019). Deoxynivalenol (DON) is one of the most ubiquitous mycotoxins worldwide (Chen et al., 2019). DON is a type-B trichothecene mycotoxin, mainly produced by *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, and *Fusarium crookwellense* (Woelflingseider et al., 2019). *Fusarium* species infect cereal grains such as wheat, maize, barley, and oats. Since DON is only partially destroyed by high

* Corresponding author at: Institute for Translational Research in Inflammation, INFINITE - Univ. Lille, Inserm, CHU Lille U1286, Faculté de Médecine - Pôle Recherche, 4ème étage Centre, Place Verdun, F-59045 Lille Cedex, France.

E-mail address: mathilde.body@univ-lille.fr (M. Body-Malapel).

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165722>

Received 1 June 2023; Received in revised form 20 July 2023; Accepted 20 July 2023

Available online 22 July 2023

0048-9697/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

temperature during processing, it is detected in feeds (Kamle et al., 2022; Zhao et al., 2021) but also in human processed food and beverage products such as breakfast cereals, bread, pizza, beer, and wine (Wang et al., 2019).

The gastrointestinal toxicity of DON is attributed to different mechanisms. The toxicity of DON is partly related to its ability to disrupt eukaryotic protein synthesis via binding to the peptidyl transferase site of the ribosome, a process known as the ribotoxic stress response (RSR) (Hooft and Bureau, 2021). DON binding to ribosomes inhibit protein translation and activates mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (Pinton et al., 2010; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2020). The MAPK family comprises several subfamilies of signaling proteins including MAPK3,1 (ERK1,2), MAPK 8,9,10 (JNK 1,2,3), MAPK14,11,12,13 (p38 α / β / γ / δ) (Lavoie et al., 2020), and they are crucial to the pro-inflammatory gene expression and apoptosis induced by DON (Lee et al., 2019; Wang et al., 2023; Zhang et al., 2020). Activation of ERK plays a pivotal role in inducing cell motility, proliferation, differentiation, and survival, whereas p38 is closely related to cell cycle progression and cell differentiation (Lavoie et al., 2020; Phan et al., 2023). The excessive oxidative stress (You et al., 2021), mitochondrial dysfunction (Wang et al., 2021), and ferroptosis induction (Liu et al., 2023) are pivotal factors of DON gastrointestinal toxicity. The adverse effects induced in mammals by dietary DON contamination on the intestinal tract has been the focus of increasing awareness and investigation. Notably, in mice, low DON concentration (25 μ g/kg bw/day for 30 days) was shown to trigger systemic and duodenal upregulation of IL-1 β secretion (Tardivel et al., 2015), and a lower dose (10 μ g/kg bw/day for 9 months) induced histomorphological and immune impairments of the intestinal tract and provoked dysbiosis (Vignal et al., 2018). More recently, dietary DON exposure (8 mg/kg food for 4 weeks) was shown to exacerbate the development of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in rats which was associated with an increased pro-inflammatory response in spleen and colon (Payros et al., 2020).

Exposure to DON can disturb gut barrier function and induce gut dysbiosis and inflammation in healthy individuals, but less is known about the effects of DON on those with pre-existing gastrointestinal disease. To better understand the etiology of DON-related health effects, we profiled molecular and physiological endpoints in murine models of induced enteritis and colorectal cancer.

2. Material and methods

2.1. Mice and experimental design

Male C57BL/6 mice (aged 7 weeks) were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) and housed under standard conditions. Mice were randomly assigned to experimental groups. Mice received 0, 10, or 100 μ g/kg bw/day of DON (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) diluted in their drinking water for 8-day treatments or in food for 90-day treatments (referred to as the control, 10 μ g DON, and 100 μ g DON groups, respectively).

2.2. Induction and macroscopic evaluation of small intestinal inflammation induced by indomethacin

To induce small intestinal injury, 20 mg/kg bw indomethacin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolved in 0.5 % carboxymethyl cellulose was orally administered to mice (Body-Malapel et al., 2019; Xiao et al., 2017). 24 h after indomethacin injection, mice were intravenously administered with 1 % Evans Blue dye (Sigma-Aldrich) in 0.9 % NaCl to visualize macroscopic lesions, and animals were sacrificed 30 min later. At necropsy, ileum, jejunum, and duodenum were separately harvested, longitudinally incised, photographed, and then immediately frozen for future analysis. The number and area of lesions were quantified using Image J software (NIH, USA).

2.3. Induction and macroscopic evaluation of azoxymethane (AOM)-DSS induced colorectal cancer

Mice were injected i.p. with 10 mg/kg AOM. After 5 days, 1.5 to 3 % DSS (TdB Labs, Ultuna, Sweden) was added to drinking water for a period of 5 days, followed by regular drinking water for 2 weeks. This cycle was repeated 3 times and mice were sacrificed 40 days after the last DSS cycle. At necropsy, colon tissue was harvested, longitudinally incised, and photographed. Macroscopically visible tumors were counted and measured using Image J software.

2.4. Histological analyses of intestinal and colon tissues

Colon, ileum, jejunum, and duodenum samples were fixed in 10 % buffered formalin for 24 h, processed, and embedded in paraffin wax by an automatic sample preparation system (LOGOS One, Milestone Medical, Sorisole, Italy). Serial histological sections of 4 μ m thickness were cut, deparaffinized, rehydrated, and stained with May Grünwald-Giemsa (MGG) for morphometric analysis under a light microscope (DM5500B; Leica Microsystems, Nanterre, France).

For steady-state experiments, measurements of duodenal, jejunal, and ileal villus height, crypt depth, and colonic mucosal surface area were performed using ImageJ software. At least 50 well-oriented mucosa, villi, and crypts were measured in at least 5 individual mice from each group of the study.

For AOM-DSS-induced colorectal cancer, colitis scores of each segment were assigned based on the extent and severity of inflammation, ulceration, and hyperplasia of the mucosa as previously described (Zaki et al., 2010). Hyperplasia scores were assigned as follows: 0 = normal (within normal limits); 1 = mild (crypts two to three times normal thickness, normal epithelium); 2 = moderate (crypts two to three times normal thickness, hyperchromatic epithelium, reduced goblet cells, scattered arborization); 3 = severe (crypts more than four times normal thickness, marked hyperchromasia, few to no goblet cells, high mitotic index, frequent arborization).

2.5. Assessment of colitis and tumorigenesis using colonoscopy

Colitis progression and tumor development were assessed using a high-resolution colonoscope (1.9 mm outer diameter; Karl Storz, Tuttlingen, Germany) at days 40, 51, 70, and 90. Mice were anesthetized using isoflurane for the duration of the procedure and closely monitored. Colitis severity was measured from recorded videos in a blinded fashion using 5 parameters described by Becker et al. (2005), including thickening of the colon, vasculature pattern, presence of fibrin, granularity of mucosal surface, and stool consistency. Each parameter was scored in a blinded fashion from 0 to 3 (with increasing severity) and totaled. Tumors observed from colonoscopy videos were counted, measured, and categorized into size: low-grade (grade 1 = very small but detectable tumor); medium-grade (grade 2 = tumor covering up to one-eighth of the colonic circumference); and grade 3 = tumor covering up to a quarter of the colonic circumference); and high-grade (grade 4 = tumor covering up to half of the colonic circumference; and grade 5 = tumor covering more than half of the colonic circumference).

2.6. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry

For antigen unmasking of formalin-fixed samples, sections were placed in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) and incubated in a heat-induced antigen retrieval chamber for 20 min at 121 °C. After washing, sections were blocked for 30 min with 5 % bovine serum albumin in PBS, stained overnight at 4 °C with anti-PCNA antibody (1:50 dilution of NB600-1331; Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), and incubated with Alexa Fluor 488 or 594 conjugated secondary antibody (1:200 dilution; Invitrogen, Waltham, MA, USA) for 1 h. Sections were counterstained with DAPI (Molecular Probes, Eugene OR, USA). To ensure

specificity of immunostaining, control sections underwent simultaneous staining without primary antibody. Quantification of positive PCNA-stained cells was performed randomly using Image J software. Images were acquired with a DM5500B microscope equipped with a DFC 310 FX camera (Leica Microsystems) and mucosal layers were photographed at a magnification of 40 \times .

2.7. Gene expression in tissues

Total mRNA from intestinal and colon samples was extracted using a Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel, Dueren, Germany). Reverse transcription was performed using a High Capacity cDNA Archive Kit and quantitative polymerase chain reaction with SYBR Green (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The primer sequences were designed using Primer Express 3 (Life Technologies) and are available upon request. Melting curve analyses were performed for each sample and gene to confirm the specificity of amplification. Because exposure to DON did not cause any significant alterations in *Polr2a* mRNA expression, the relative expression of each gene of interest was normalized relative to the expression of this gene. The quantification of the target gene expression was based on the comparative cycle threshold (Ct) value. The fold changes in the target genes were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

2.8. Bacterial DNA extraction and sequencing

Genomic DNA was extracted from the cecal luminal content using a DNA stool kit (Macherey-Nagel). The quantity and purity of DNA (expressed as the ratio of absorbance at 260 nm and 280 nm (A260/A280)) were assessed using a Nanodrop[®] spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The sequencing library was generated by amplifying the V3-V4 region of the bacterial 16S-rRNA gene using 16S rRNA amplicon generation for MiSeq with the primers Bact-0341 (CCTACGGGNGGCWGCAG) and Bact-0785 (GAC-TACHVGGGTATCTAATCC). Individual samples were barcoded, pooled to construct the sequencing library, and sequenced using a MiSeq instrument (Illumina, San Diego, CA, USA) to generate paired-end 2 \times 300 bp reads.

2.9. Analysis of sequencing data

Bioinformatic analyses were performed using the QIIME2 pipeline (version 2020.2) (Bolyen et al., 2019). The Divisive Amplicon Denoising Algorithm (DADA-2) plug-in in QIIME2 was used to filter, dereplicate, identify chimeric sequences, and merge paired-end reads to obtain a set of amplicon sequence variants (ASVs) for each sample (Callahan et al., 2016). Then representative sequences were selected for each ASV. The classify-sklearn plug-in in QIIME2, with the Silva database (version 132), was applied to assign a taxonomic annotation to each representative ASV sequence. In the next step, ASVs identified as eukaryotic contamination (none), and external contamination identified with the decontam package (57 ASVs; 3745 reads), were filtered out (Davis et al., 2018). Diversity metrics (α and β diversity) were obtained with the QIIME2 core-metrics-phylogenetic plug-in, with p-sampling depth parameter fixed to 14,616 reads which corresponded to the total frequency that each sample should be rarefied to prior to computing diversity metrics. This sampling depth allowed retention of >70 % of reads and only two samples were discarded. Tests for differential relative abundance were performed with ANCOM and corncob at the order, family, and genus levels (Mandal et al., 2015; Martin et al., 2020).

To retrieve functional profiles for the ASV data, sequences and abundance tables were used as inputs for Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States 2 (PICRUSt2) software analysis (Douglas et al., 2020). The differentially abundant Metacyc pathways were identified using ALDEx2 (Fernandes et al., 2014). ALDEx2 outputs the effect size which indicates the direction and

volume of change of the centered log ratios. In our study, a positive sign indicated that the feature was more abundant in the 100 μ g DON group whereas a negative sign indicated greater abundance in the control group.

2.10. Measurement of luminal fucose and rhamnose content

Stool samples were solubilized in PBS with 0.05 % Tween[®] 20 and centrifuged for 10 min at 10,000g. Soluble fractions were freeze-dried and then methanolysis (MeOH with 0.5 N HCl) was performed at 80 $^{\circ}$ C for 18 h. A dot of silver carbonate (Sigma-Aldrich) was added with acetic anhydride (Sigma-Aldrich) overnight. The methanolic phase was washed with heptane. Finally, derivatization was performed using a 99:1 mixture of BSTFA-TMCS and pyridine (Sigma-Aldrich). The resulting monosaccharides were analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using a SOLGEL-1MS column (30 m \times 0.25 mm i.d.; SGE Analytical Science, Trajan Scientific and Medical, Morrisville, NC, USA). The temperature of the column increased from 120 $^{\circ}$ C to 240 $^{\circ}$ C at a rate of 2 $^{\circ}$ C per min and a terminal level during 10 min. Myo-inositol (Sigma-Aldrich) was used as an internal standard.

2.11. Measurement of luminal fucosidase activity

Fucosidase activity was assessed in stool samples according to a previously described protocol (Steimle et al., 2021).

2.12. Statistical analyses

Data are presented as the mean \pm standard error of the mean. Comparisons between different treatment groups were performed using the nonparametric Mann-Whitney *U* test. Spearman's correlation and other statistical analyses were performed using Prism 8 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). Sequencing data was analyzed using the Wilcoxon Rank Sum test, with Benjamini-Hochberg correction for multiple testing. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Short-term exposure to low DON concentration induces epithelial proliferation in colon and small intestine

To assess the effects of short exposure to DON on intestinal homeostasis, mice were exposed to DON for 8 days. Mucosal surface area was significantly increased in the 100 μ g DON group compared to control mice (Fig. 1A and B). To confirm alterations in epithelial proliferation, PCNA expression was assessed in colon sections (Fig. 1C). A significant enhancement of PCNA staining in the 100 μ g DON group compared with control mice was observed (Fig. 1D). Neither mucosal surface area nor PCNA staining were significantly different in the 10 μ g DON group relative to controls.

For analysis of the small intestine, villi and crypts were measured. In duodenum, jejunum, and ileum, the size of villi did not vary in mice exposed to DON compared with control mice (Fig. 1E). However, crypt size was higher in DON-exposed mice in the three intestinal tissues (Fig. 1F). Oral exposure at both dosages consistently decreased the villi/crypt ratio in duodenum, jejunum, and ileum (Fig. 1G). A significant enhancement of PCNA staining was observed in the ileum, jejunum, and duodenum of DON-exposed mice at both dosages (Fig. 1H-I). In summary, after 8 days of DON ingestion epithelial proliferation was enhanced in colon in the 100 μ g DON group and in small intestine in both treatment groups.

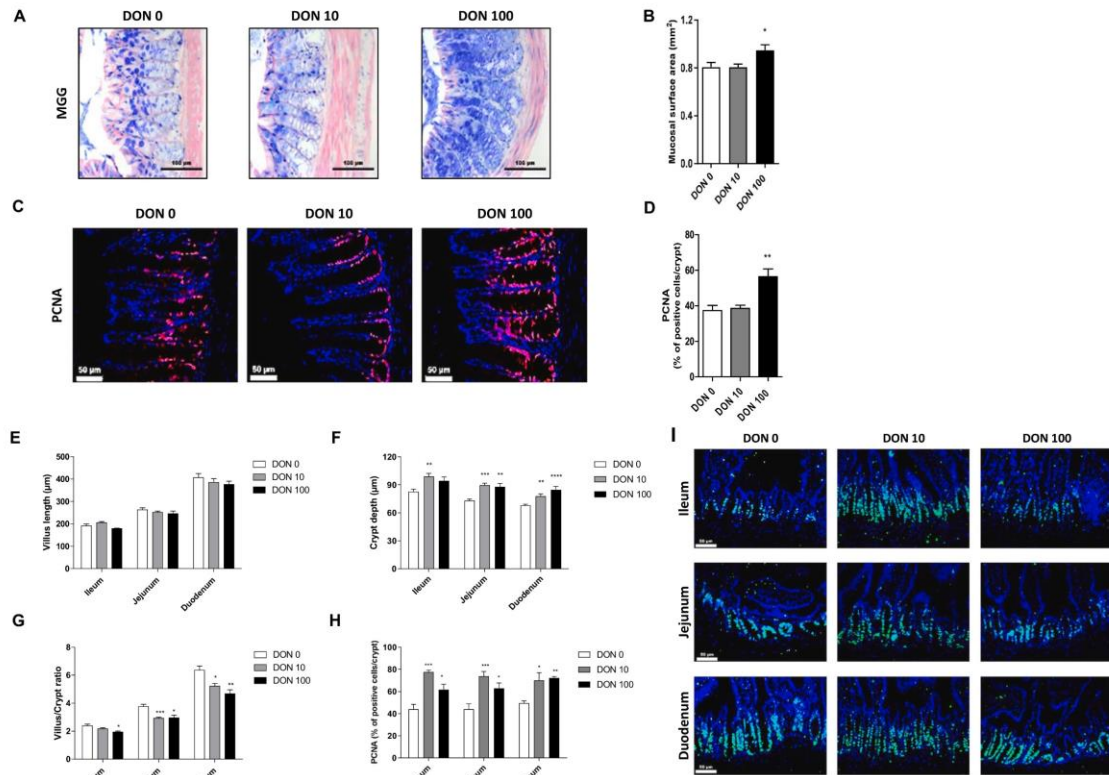


Fig. 1. Effect of 8-day deoxynivalenol (DON) exposure on colon and small intestine histomorphology and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression (0, 10, and 100 µg DON/kg bw/day groups; $n = 10$ per group). (A–B) Histomorphological assessment of May Grünwald-Giemsa (MGG)-stained colon sections including (A) representative images, and (B) quantification of mucosal area. (C) PCNA immunostaining of colon sections (red). (D) Quantification of PCNA-positive cells. (E–G) Histomorphological assessment of May Grünwald-Giemsa-stained ileum, jejunum, and duodenum sections including (E) villus length, (F) crypt depth, and (G) villus/crypt ratio. (H–I) PCNA immunostaining of small intestine sections (green) including (H) quantification of PCNA positive cells, and (I) representative images. Data are from two independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, and **** $p < 0.001$ compared to the DON 0 group as determined by the Mann-Whitney U test.

3.2. Short-term exposure to low DON concentration exacerbates indomethacin-induced enteritis

To investigate whether DON exposure intensifies small intestine inflammation, the effect of 8-day DON exposure on the severity of indomethacin-induced enteropathy was examined (Fig. 2A). Enteritis was induced by oral gavage with indomethacin and monitored 24 h later. Ulcerative lesions were observed, particularly in the ileum and jejunum, and these lesions were more extended in mice exposed to DON compared to control mice (Fig. 2B–C). DON oral administration induced gene expression of inflammatory cytokines in small intestine of mice, with significant increases of $Tnf\alpha$, $Il1\beta$ and $Ifny$ levels in ileum of mice of both DON treatment groups (Fig. 2D–F). Therefore, DON exposure enhanced enteritis in this experimental model of indomethacin-induced enteritis.

3.3. Chronic DON exposure exacerbates AOM-DSS-induced colorectal carcinogenesis

The impact of DON exposure on colitis-associated carcinogenesis was investigated. In the first set of experiments, wild-type mice were treated with AOM, 1 cycle of 1.5 % DSS then 2 cycles of 2.5 % DSS, and

concomitantly exposed to DON at 10 and 100 µg/kg bw/day for 90 days (Fig. 3A). The development of colitis was monitored by colonoscopy. Mice in the 100 µg DON group had significantly increased colitis scores on days 40, 51, 70, and 90 compared to controls (Fig. 3B). At the culmination of the experiment on day 90, all parameters for colitis assessment were significantly elevated, resulting in a considerable increase in the colitis score for the 100 µg DON group compared to controls (Fig. 3C–E). The total colitis histological score was significantly greater in mice exposed to both dosages of DON compared to untreated mice.

The effect of DON exposure on colorectal cancer development was also investigated. The total number of tumors rose over time without significant variations between the experimental groups (Fig. 4A). However, after 90 days of exposure, a decrease in low-grade tumors numbers and significant increase in medium- and high-grade tumors numbers was found for mice in the 100 µg DON group compared to control mice, and a dose-dependent effect was observed (Fig. 4B–C).

The second chronic study involved a more severe induction of colorectal cancer (3 % DSS, Fig. 5A–C). The number of colon tumors at day 90 was significantly increased in DON-intoxicated mice compared to control mice (Fig. 5B). Although the number of tumors <1 mm did not vary between the control and treatment groups, there was an increase of

M. Djouina et al.

Science of the Total Environment 900 (2023) 165722

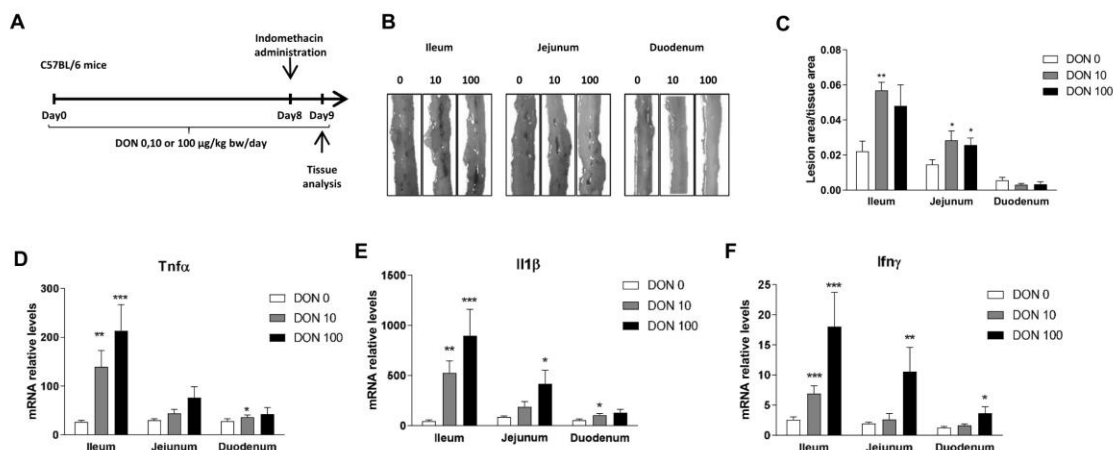


Fig. 2. Effect of 8-day deoxynivalenol (DON) exposure on indomethacin-induced enteritis (0, 10, and 100 µg DON/kg bw/day groups; n = 10 per group). (A) Experimental design. (B) Representative images of intestinal lesions. (C) Quantification of lesion area/tissue area ratio. (D–F) Quantification of intestinal mRNA levels of (D) *Tnfα*, (E) *Il1β* and (F) *Ifnγ*. Data are from two independent experiments. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.005 compared to the DON 0 group as determined by the Mann-Whitney *U* test.

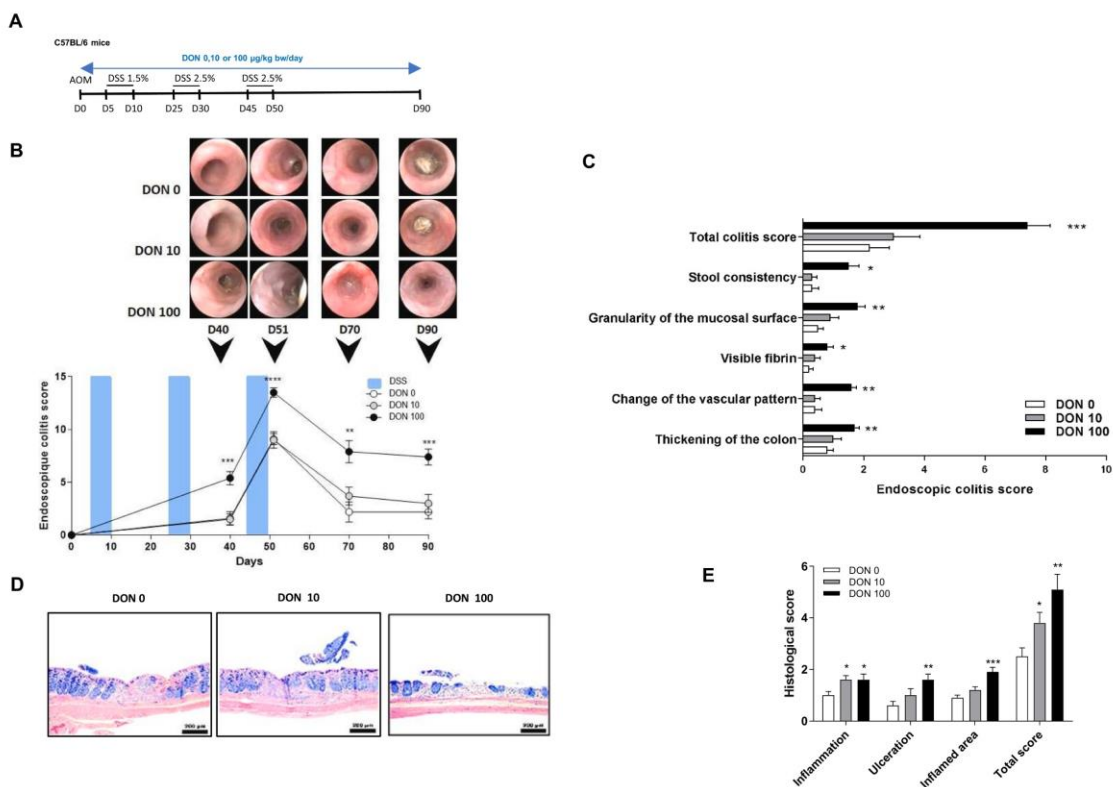


Fig. 3. Effects of chronic exposure to deoxynivalenol (DON) in the development of colitis in the azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced model of colorectal cancer (0, 10, and 100 µg DON/kg bw/day groups; n = 10 per group). (A) Experimental design. (B) Follow-up endoscopic scoring of colitis intensity including endoscopic scores and their representative video captures. (C) Detailed endoscopic colitis scores at the experimental endpoint. (D–E) Histological assessment of colitis including (D) representative May Grünwald-Giemsa-stained colon sections, and (E) the colitis histological score. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.005 compared to the DON 0 group as determined by the Mann-Whitney *U* test.

M. Djouina et al.

Science of the Total Environment 900 (2023) 165722

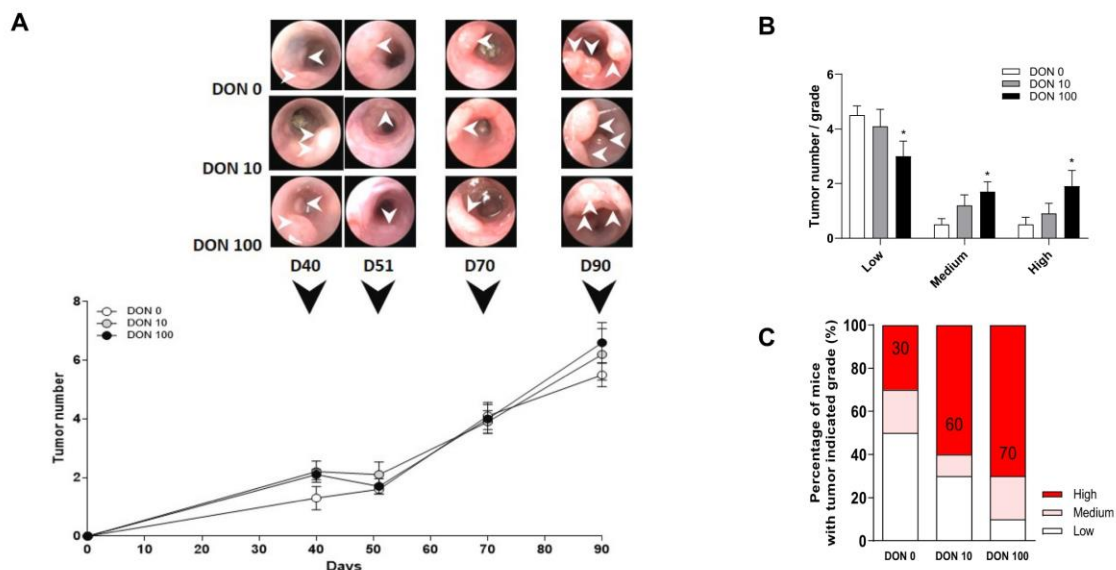


Fig. 4. Endoscopic assessment of protumorigenic effects of deoxynivalenol (DON) exposure in colorectal cancer (0, 10, and 100 µg DON/kg bw/day groups; n = 10 per group). (A) Follow-up endoscopic scoring of tumorigenesis: endoscopic score and their representative video captures. White arrows refer to tumors. (B) Number of tumors according to their grade. (C) Percentage of mice with tumor indicated grade as worse tumor grade. *p < 0.05 compared to DON 0 group as determined by the Mann-Whitney U test.

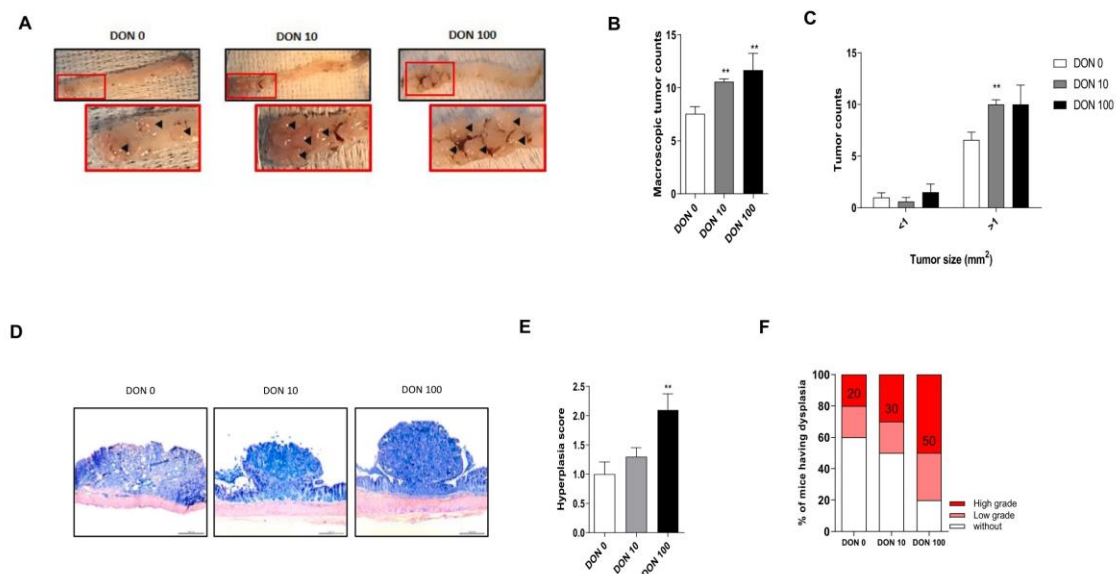


Fig. 5. Macroscopic and histological assessments of the protumorigenic effects of deoxynivalenol (DON) exposure on colorectal cancer (0, 10, and 100 µg DON/kg bw/day groups; n = 10 per group). (A–C) Macroscopic assessment of tumorigenesis including (A) representative colon images, black arrows refer to tumors. (B) macroscopic count of tumors, and (C) tumor counts by size. (D–F) Histological assessment of tumorigenesis including (D) representative May Grünwald-Giemsa-stained colon sections, (E) hyperplasia scores, and (F) percentage of mice with dysplasia. **p < 0.01 compared to the DON 0 group as determined by the Mann-Whitney U test.

tumors >1 mm in mice exposed to DON (Fig. 5C). At the histological level, severity of hyperplasia was significantly higher in colon of the 100 µg DON group compared to control mice (Fig. 5D–E). In a dose-dependent manner, DON exposure was associated with an increase of mice with high-grade dysplasia and a decrease of mice with low-grade or no dysplasia (Fig. 5F). These results show that ingestion of DON at 100 µg/kg bw/day worsened intensity of colitis and tumorigenesis in this murine model of AOM-DSS-induced colorectal cancer.

Activation of ERK signaling pathway has been demonstrated as mediating the effects of DON (Pinton et al., 2010; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2020). Therefore, we assessed whether the ERK signaling genes were modulated by DON exposure in the model of AOM-DSS-induced colorectal cancer (Suppl Fig. 1). The level of genes encoding ERK2 and ERK1, Mapk1 and Mapk3 respectively, were significantly higher in both CRC groups exposed to DON compared to control CRC group. DON exposure significantly upregulated upstream genes, the dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1 and 2 (Map2k1 and Map2k2), encoding MEK1 and MEK2 respectively. MAP-interacting kinase 1 and 2 (Mknk1 and Mknk2) transcripts were both enhanced in the 100 µg DON group, Mknk2 was also higher in the 10 µg DON group. Among the ERK target genes involved in cell proliferation, in accordance with an increased cell proliferation, ETS domain-containing protein Elk-1 (Elk1) and ETS domain-containing transcription factor ERF (Erf) showed respectively an upregulation and down-regulation trend, and transcriptional regulator ERG (Erg) and ETS translocation variant 1 (Etv1) were upregulated in DON-exposed CRC groups. DON exposure enhanced the relative expression of Apoptosis regulator Bcl-2 (Bcl2) and Bcl-2-like protein 1 (Bcl2l1) antiapoptotic

factors. The RNA polymerase I-specific transcription initiation factor (Rrn3) and the regulatory-associated protein of mTOR (Rptor) genes, involved in ERK regulation of cell growth, were upregulated in DON-exposed CRC groups compared to control CRC group. These results suggest that ERK signaling pathway could participate to DON dysregulation of cell proliferation and survival in the AOM-DSS colorectal cancer model.

3.4. DON effects on the gut microbiome

16S rRNA gene-based analysis was used to profile bacterial microbiota in mouse cecal content (Fig. 6). For the 4 α-diversity indices tested, biodiversity was significantly higher in colorectal cancer (CRC) mice exposed to DON compared to control CRC mice (Fig. 6A). In addition to α-diversity, the unweighted Unifrac distance and Bray-Curtis dissimilarity matrix were analyzed to compare similarities among gut microbial communities (β-diversity; Fig. 6B). A significant clustering was found in the principal coordinate analysis plots of these two indices showing that DON treatment at both dosages altered bacterial community structure.

ANCOM (Fig. 6) and corncob (Suppl Figs. 2–4) algorithms were used to investigate relative differences in taxonomic abundance between the three study groups. ANCOM incorporates the compositionality of microbiome data, has a low-false-positive rate, and allows covariate adjustment. Results show the differential abundance of taxa in DON-exposed CRC mice compared to control CRC mice. The order *Anaeroplasmatales* was less abundant in the 10 µg DON group (Fig. 6C). The order *Campylobacteriales* was enriched in mice in both DON treatment groups. At the family level, *Anaeroplasmataceae* was found to be less

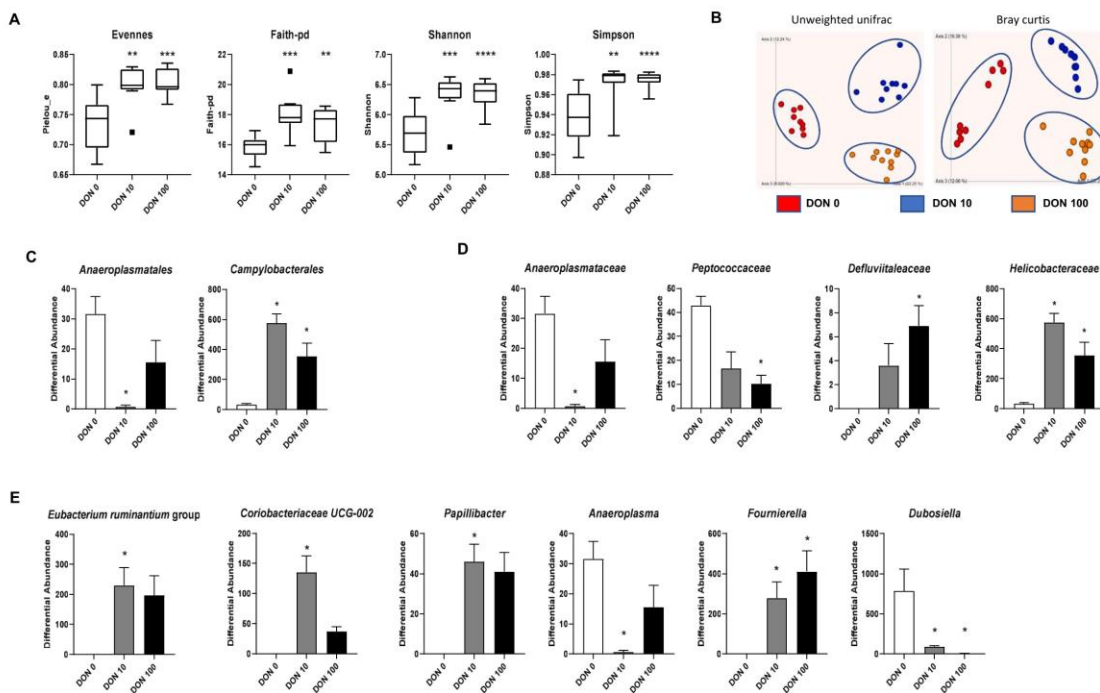


Fig. 6. Effects of deoxynivalenol (DON) exposure on cecal content microbiome of mice with colorectal cancer (0, 10, and 100 µg DON/kg bw/day groups; n = 10 per group). (A) Alpha-diversity of microbial taxa. Box-plots represent α-diversity metrics: Pielou's evenness, Faith's phylogenetic diversity, Shannon's index, and Simpson's index. **p < 0.01, ***p < 0.005, and ****p < 0.001 compared to the DON 0 group as determined by the Kruskal-Wallis pairwise test. (B) Principal coordinate analysis plots representing the β-diversity for unweighted Unifrac distance and Bray-Curtis dissimilarity. Red dots = DON 0, blue dots = DON 10, and orange dots = DON 100 groups. (C) Differential abundance of significantly changed bacterial orders. (D) Differential abundance of significantly changed bacterial families. (E) Differential abundance of significantly changed bacterial genera. For (C–E), * indicates bacteria which reject the null hypothesis >95 % with ANCOM.

M. Djouina et al.

Science of the Total Environment 900 (2023) 165722

abundant in the 10 µg DON group; *Peptococcaceae* and *Deftuviitaleaceae* were more abundant in the 100 µg DON group (Fig. 6D); and *Helicobacteraceae* was significantly enriched in mice from both DON treatment groups. At the genus level, the *Eubacterium ruminantium* group, *Coriobacteriaceae* UCG-002, and *Papillibacter* were found to be more abundant in the 10 µg DON group, and *Anaeroplasm* was less abundant in the 100 µg DON group (Fig. 6E). Most notably, the relative abundance of *Fournierella* and *Dubosiella* genera were respectively higher and lower after exposure to 10 and 100 µg/kg bw/day of DON. The two latter genera, as well as all the orders and families detected as significantly different with ANCOM, were also verified with corncob.

3.5. Functional gene analysis

The bioinformatic software package PICRUST2 was used to predict the MetaCyc pathways of microbiota and the significantly changed MetaCyc pathways are shown in Fig. 7A. Six pathways were enriched in the control CRC group compared with the 100 µg DON group, including the superpathway of methanogenesis from acetate (METH-ACETATE-PWY; effect size -1.8; $p = 0.02$) and two pathways related to toluene degradation (PWY-5182 and PWY-5180; effect size -1.1; $p = 0.01$ for both). Twelve Metacyc pathways were identified as enriched in DON-exposed mice. Among them, three were related to fucose and rhamnose degradation (FUC-RHAMCAT-PWY, RHAMCAT-PWY, and FUCCAT-PWY; effect sizes 3, 2.6, and 2.3 respectively; $p = 0.001$). The pathway with highest enrichment, the superpathway of fucose and

rhamnose degradation enzymes (FUC-RHAMCAT-PWH), was three-fold more abundant in the 100 µg DON group compared with the control CRC group ($p < 0.001$; Suppl Fig. 5A).

Most of the functional genes of the superpathway of fucose and rhamnose degradation enzymes were much more abundant in DON-exposed microbiota (Fig. 7B). Genes encoding three out of the 4 enzymes involved in the transformation of β- l-fucose to (S)-lactaldehyde, namely l-fucose mutarotase (FucU), l-fucose isomerase (FucI), and l-fuculokinase (FucK), were underrepresented; and l-fuculose-phosphate aldolase (FucA) did not vary. DON exposure also increased the relative abundance of all genes associated with the transformation of α-l-rhamnopyranose to (S)-lactaldehyde, including l-rhamnose mutarotase (RhaM), l-rhamnose isomerase (RhaA), rhamnulokinase (RhaB) and rhamnulose-1-phosphate aldolase (RhaD). Suppl Fig. 5B shows the bacterial genera which were significantly associated with the relative abundance of FUC-RHAMCAT-PWH. Twenty-five genera were positively associated with FUC-RHAMCAT-PWH, with *Ruminococcus* UCG-014 presenting the highest positive correlation level (Spearman rho 0.8872; 95 % CI 0.7184 to 0.9574; $p < 0.0001$). Eleven genera were negatively associated, with *Ruminiclostridium* presenting the highest negative correlation (Spearman rho -0.8018; 95 % CI 0.9229 to -0.5364; $p < 0.0001$).

3.6. Effect of DON on microbiota fucose and rhamnose metabolism

To further explore the increased fucose and rhamnose degradation

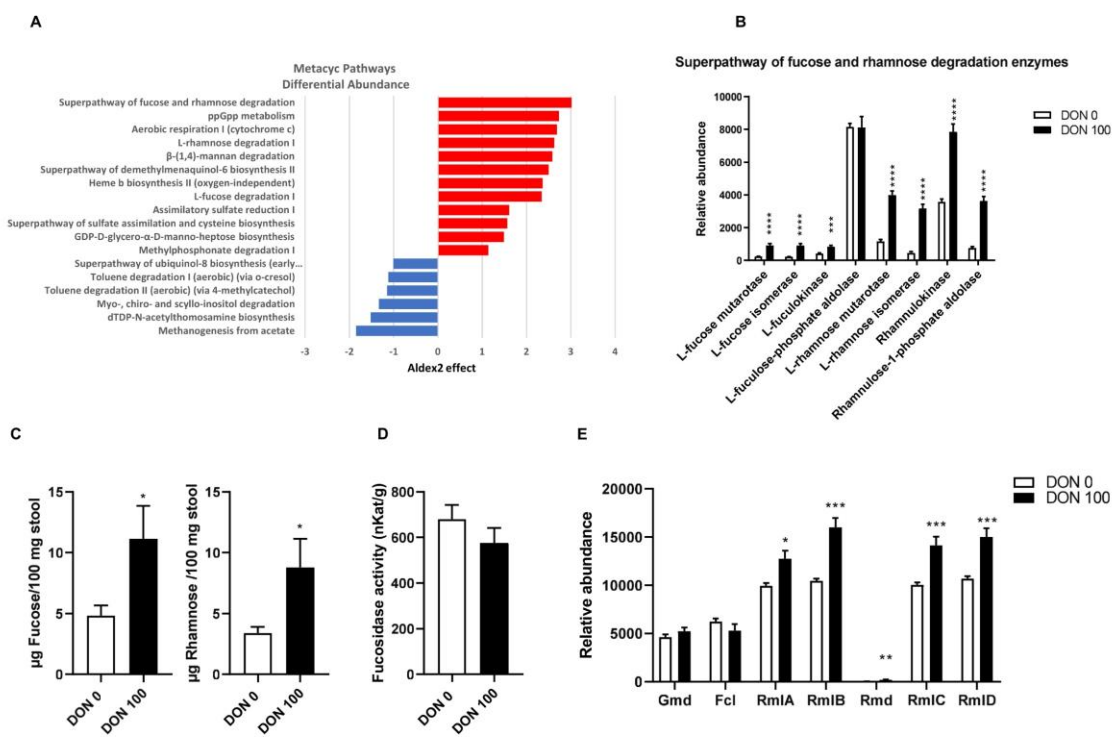


Fig. 7. Effects of deoxynivalenol (DON) exposure on microbiota fucose and rhamnose metabolism in mice with colorectal cancer. (A-B) Predicted Metacyc pathways in mice with colorectal cancer unexposed or exposed to deoxynivalenol (DON) (100 µg/kg bw/day). (A) Differential abundance of significantly changed Metacyc pathways. $p \leq 0.01$ as determined by the Wilcoxon test. (B) Relative abundance of genes constituting the superpathway of fucose and rhamnose degradation enzymes. (C) Fucose and rhamnose levels within stool. (D) Stool fucosidase activity. (E) Relative abundance of genes involved in eukaryotic fucose incorporation (Gmd and Fcl) and in fucose and rhamnose biosynthesis (RmlA, RmlB, Rmd, RmlC, RmlD). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, and **** $p < 0.001$ compared to the control group as determined by the Mann-Whitney U test.

induced in microbiota by DON exposure, we quantified fucose and rhamnose content in mouse stool by GC/MS (Fig. 7C). The levels of luminal fucose and rhamnose were significantly higher in DON-exposed CRC mice than in the control CRC mice. Microbiota fucosidase activity was measured to determine whether this was causing an increase in these sugars. Luminal fucosidase activities were similar between DON-exposed CRC mice and control CRC mice (Fig. 7D).

Next, genes associated with the incorporation of fucose into eukaryotic glycoproteins, glycolipids, and bacterial polysaccharides, specifically GDP-mannose 4,6-dehydratase Gmd and GDP-L-fucose synthetase Fcl were assayed and found to be unmodified by DON exposure (Fig. 7E) (Coyne et al., 2005). Two genes involved in the common first steps of fucose and rhamnose biosynthesis, glucose-1-phosphate thymidyltransferase RmlA and dTDP-glucose 4,6-dehydratase RmlB, had higher expression in DON-exposed CRC mice relative to control CRC mice. Genes involved in fucose biosynthesis, such as dTDP-4-dehydro-6-deoxyglucose reductase Fcd and dTDP-fucopyranose mutase Fcf2, were not found in the PICRUSt2 data. But genes associated with rhamnose biosynthesis were more abundant in DON-exposed mice. Indeed, GDP-4-dehydro-6-deoxy-D-mannose reductase Rmd involved with biosynthesis of GDP-D-Rhamnose, as well as dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase RmlC and dTDP-4-dehydrorhamnose reductase RmlD, involved with biosynthesis of dTDP-L-Rhamnose, were overrepresented in microbiota of DON-exposed CRC mice. Overall, the increased levels of luminal fucose and rhamnose and the overrepresentation of genes associated with both degradation and biosynthesis of these sugars show that chronic DON exposure led to worse outcomes in an AOM-DSS-induced colorectal cancer model which was associated with altered microbiotic fucose and rhamnose metabolism.

3.7. Correlation between gut microbiota and colorectal cancer markers

To further analyze the relationship between gut microbiota and colorectal cancer development, the correlations between the changed gut microbiota and measured AOM-DSS colorectal cancer variables were explored by Spearman's correlation analysis and presented by a heatmap (Fig. 8). The results from the order-level analysis showed that the change in abundance of *Anaeroplasmatales* was negatively correlated with the mRNA levels of a majority of ERK signaling genes. The abundance of *Campylobacteriales* was inversely positively correlated with ERK signaling genes, as well as with histological colitis parameters. The results revealed strong negative correlations between the abundance of *Anaeroplasmataceae* family and most of ERK signaling genes. There were similar correlations for the *Peptococcaceae* family, which was also negatively associated with several parameters of colon inflammation. The two other families, *Deftuvitaleaceae* and *Helicobacteraceae*, were positively associated with ERK signaling gene levels. Moreover, both families showed positive correlations with colitis parameters, and *Deftuvitaleaceae* abundance was positively associated with medium and high tumor count and hyperplasia score. Four bacterial genera were positively correlated with several ERK signaling gene levels, *Eubacterium ruminantium* group, *Coriobacteriaceae* UCG-002 group, *Papillibacter*, and *Fournierella*. These last two genera were also positively correlated with several inflammation parameters. In addition, *Eubacterium ruminantium* group abundance was positively correlated with three tumorigenesis parameters. The results also revealed significant negative correlations between the *Anaeroplasmata* and *Dubosiella* genera and ERK signaling gene expression. Most importantly, these analyses showed strong negative correlations between *Dubosiella* abundance and a majority of colitis and tumorigenesis parameters. Furthermore, *Mapk1*, *Mapk3*, *Map2k1*, *Map2k2*, *Bcl2* and *Bcl2l1* transcript levels were significantly correlated with 11/12 bacterial strain abundance, showing a close relationship

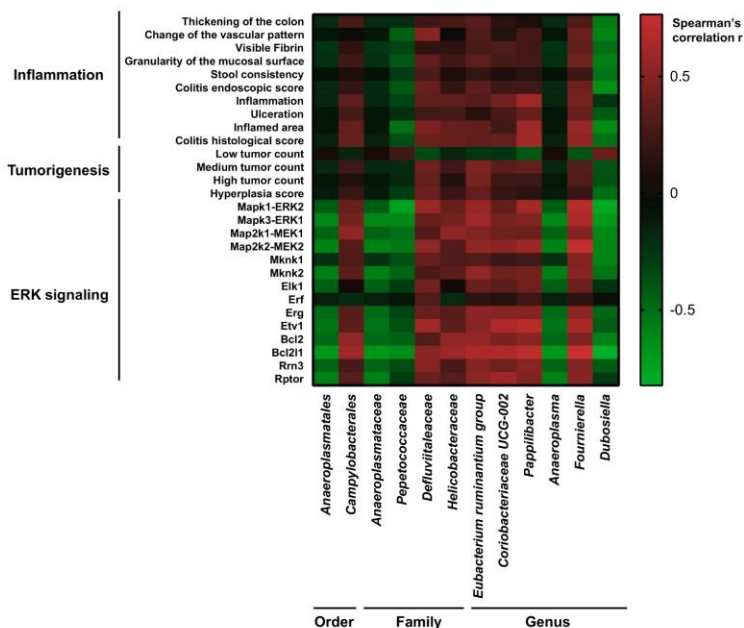


Fig. 8. Heatmap of Spearman's rank correlation between the abundance of the changed gut microbiota and colon inflammation, tumorigenesis and ERK signaling variables measured in mice with colorectal cancer unexposed or exposed to deoxynivalenol (DON) (100 µg/kg bw/day). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005, and ****p < 0.001.

between gut microbiota variation and ERK signaling in DON-induced worsening of colorectal cancer.

4. Discussion

In this study, we explored the impact of DON exposure in murine models at doses relevant to human exposure. For deoxynivalenol, JECFA (joint FAO/WHO expert committee on food additives) set the tolerable daily intake at 1 µg/kg bw/day (Knutson et al., 2017). The translation from humans to animals using the body surface area normalization method gives the dose of 12 µg/kg bw/day (Reagan-Shaw et al., 2008). Besides, in the assessment of DON exposure by EFSA CONTAM panel (European Food Safety Authority panel on Contaminants in the Food Chain) performed across 39 different dietary surveys and all age groups, the 95th percentile acute exposure ranged from 0.7 to 6.7 µg/kg bw/day. Their translation to mouse gives doses of 8.6 to 83 µg/kg bw/day. Therefore, we selected 10 and 100 µg/kg bw/day as representative doses of realistic human exposure. These concentrations are much lower than those commonly used in the literature (Grenier and Applegate, 2013), and allowed us to assess the toxicity of DON closer to human exposure conditions. At both dosages after 8 days of exposure, a significant increase in intestinal epithelial cell proliferation was observed as evidenced by enhanced crypt length and PCNA staining in ileum, jejunum, and duodenum of mice. A similar increase in intestinal epithelial proliferation has been described in mice jejunum following longer exposure conditions (9 months) or at a higher concentration (2 mg/kg bw/day) (Vignal et al., 2018; Zhou et al., 2019). An increase of crypt depth has been shown in piglet jejunum and duodenum after 10 days exposure at 0.9 mg/kg of feed (Alizadeh et al., 2015) and in pig jejunum after 6 weeks exposure at 12 µg/kg bw/day (Przybylska-Gornowicz et al., 2015). Data from the literature have described an increase of epithelial proliferation in protocols with exposure times at least 5 times longer or with exposure concentrations 9 to 200 times higher. Thus, our assessment of DON toxicity, which is closer to human exposure conditions, highlights the risks associated with short-term intake of even low levels of this toxin.

Concerning effects of DON ingestion on the small intestine, short-term intoxication was found to exacerbate the severity of indomethacin-induced enteritis. DON ingestion has been shown to predispose broiler chickens to the development of an infectious model of enteritis (induced by *Clostridium perfringens*) (Antonissen et al., 2014). Moreover, dietary contamination with DON (8 mg/kg of food for 4 weeks) increased the severity of colon injury in a rat model of DSS-induced colitis (Payros et al., 2020). More recently, a 28-day exposure to 25 and 50 µg/kg bw/day of DON aggravated colitis in C57BL/6 mice, which is consistent with our data (Gan et al., 2023). Cumulatively, these data suggest that DON exposure has the potential to aggravate any pre-existing inflammatory condition in small intestine, regardless of its origin. Therefore, the involvement of DON in the development of infectious and food-allergic enteritis, appendicitis, peptic ulcers, and inflammatory bowel diseases deserves more investigation.

In addition to inflammatory conditions, here we showed that DON exposure can also enhance carcinogenesis *in vivo* in the AOM-DSS-induced model of colorectal cancer. A deep analysis of cecal microbiota diversity, structure, and function was performed to better understand how DON exposure can alter microbial pathways and possibly affect CRC promotion. The α -diversity metric, which describes the relative number of bacterial taxa, was greater in DON-exposed mice compared to controls. Moreover, the β -diversity indices indicated strong differences in microbiotic composition between the three groups of mice. This variability was mainly attributable to a small subgroup of bacterial taxa. The most notable effect was increased relative abundance of the *Campylobacterales* order in both DON exposure groups, which includes the *Helicobacteraceae* family. Although *Helicobacter hepaticus* has been shown to promote AOM-initiated colon tumorigenesis (Nagamine et al., 2008), our analysis did not show significant variation of

this strain.

The results of the Spearman's correlation analysis globally show strong correlations between the modified bacteria and the variables characterizing colorectal cancer, what further argues in favor of an important role of intestinal microbiota in the protumorigenic effects of DON. The overabundance of *Eubacterium ruminantium* group, *Coriobacteriaceae* UCG-002, *Papillibacter* and *Fournierella*, as well as the underabundance of *Anaeroplasma* and *Dubosiella* may contribute to DON-induced CRC exacerbation. Particularly, our findings showing negative correlations between most of the measured variables and the abundance of *Dubosiella* suggest that the defect of this strain could be an important contributing mechanism to the worsening effect of DON in the AOM-DSS model.

PICRUSt2 analysis showed dysregulation of several microbiotic gene pathways in mice exposed to DON, including those associated with the degradation of fucose. These results are consistent with a previous study which showed a decreasing trend of the relative abundance of the fucose fraction within intestinal mucin oligosaccharide profiles of broiler chicken duodenum exposed to a DON-contaminated diet (Antonissen et al., 2015). In the mammalian gastrointestinal tract, fucose is an abundant component of glycans that decorate proteins and lipids, especially on the lumen-facing epithelial surface and in mucosal secretions (Pickard and Chervovsky, 2015). Fucosylated proteins are shed into the lumen and fucose is liberated and metabolized by diverse gut microbiota (Bocci and Winzler, 1969). Many symbiotic gut bacteria species can and do use fucose, and it has been found to be protective in several disease models, such as on commensal bacteria in cases of intestinal pathogen infection (Garber et al., 2021; Pickard et al., 2014). Fucose can ameliorate intestinal inflammation, as exogenous administration of fucose has been shown to inhibit chronic colitis development in mice (Ke et al., 2020). Furthermore, L-rhamnose and L-fucose can suppress cancer growth in mice (Tomsik et al., 2011), and host fucosylation deficiency in mice led to colitis and adenocarcinoma (Wang et al., 2017). Therefore, it can be hypothesized that the dysregulation of fucose and rhamnose metabolism in DON-exposed mice may be a mechanism that potentiates colorectal tumorigenesis.

Other potential mechanisms can also participate in the protumorigenic effect of DON such as increasing the carcinogenic potential of genotoxins present in the diet or in the microbiota. For example, in the non-transformed intestinal epithelial cell line IEC-6, DON is not genotoxic on its own but aggravates DNA damage induced by a broad spectrum of genotoxic agents such as etoposide, cisplatin, and phleomycin (Garofalo et al., 2022). In addition, dietary contamination with DON increased intestinal DNA damage in rats colonized with *E. coli* which produce colibactin - a polyketide peptide which can alkylate DNA (Payros et al., 2017).

5. Conclusion

Epithelial cell proliferation was increased in duodenum, jejunum, ileum, and colon in mice after 8-day exposure to DON at a dose which is translational to human dietary exposure. DON exposure also led to exacerbation of indomethacin-induced enteritis intensity and colorectal carcinogenesis development in murine model systems. The protumorigenic effect of DON was associated with altered gut microbiota diversity, composition, and metabolism of fucose and rhamnose.

This study adds to our knowledge of the harmful effects of DON in the gut and highlights the need to pay particular attention to individuals with intestinal susceptibility. More studies are required to better characterize the effects of DON ingestion on the development of colorectal cancer, and to assess the relevance of these effects in humans.

Authors' contribution

MBM and MD performed the study conceptualization. Fucose and rhamnose measurements by GC/MS were performed by KL. Fucosidase

activity assay was performed by AS and M.S.D. SC, DB and DH performed microbiota analyses. Other experiments, data collection, and analyses were performed by MD, CW, MBM, and CV. MD developed endoscopy methodology. CV, LD, and DL contributed to supervision and funding acquisition. The draft of the manuscript was written by MBM. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by a grant from the FHU Imminent and a grant from the French National Research Agency (ANR EVICTION).

Ethics approval

All animal procedures were approved by the regional Animal Experimentation Ethics Committee (Comité d'Éthique en Expérimentation Animale, Hauts-de-France, CEEA 75) and the French Ministry of Higher Education and Research (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche) (authorization numbers: APAFIS #9249-2017031312157794 and 2020071610201738). Mice received human care in compliance with European animal welfare regulations (European Communities Council Directive of 1986 revised in 2010, 2010/63/EU).

Declaration of competing interest

The authors declare no competing financial interest.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

The authors thank Thomas Hubert and the staff of the animal facilities of Lille University Hospital (DHURE & EOPS). We are grateful to Bernadette Leu for her excellent broad range of help. Editorial assistance, in the form of language editing and correction, was provided by XpertScientific Editing and Consulting Services.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165722>.

References

Alizadeh, A., Braber, S., Akbari, P., Garssen, J., Fink-Gremmels, J., 2015. Deoxynivalenol impairs weight gain and affects markers of gut health after low-dose, short-term exposure of growing pigs. *Toxins* 7, 2071–2095. <https://doi.org/10.3390/toxins7062071>.

Antonissen, G., Immerseel, F.V., Pasmans, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Timbermont, L., Verlinden, M., Janssens, G.P.J., Eeckhout, V., Eeckhout, M., Saeger, S.D., Hensenberger, S., Martel, A., Croubels, S., 2014. The mycotoxin deoxynivalenol predisposes for the development of clostridium perfringens-induced necrotic enteritis in broiler chickens. *PLoS One* 9, e108775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108775>.

Antonissen, G., Van Immerseel, F., Pasmans, F., Ducatelle, R., Janssens, G.P.J., De Baere, S., Mountzouris, K.C., Su, S., Wong, E.A., De Meulenaer, B., Verlinden, M., Devreese, M., Haesebrouck, F., Novak, B., Dohmal, I., Martel, A., Croubels, S., 2015. Mycotoxins deoxynivalenol and fumonisins alter the extrinsic component of intestinal barrier in broiler chickens. *J. Agric. Food Chem.* 63, 10846–10855. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04119>.

Becker, C., Fantini, M.C., Wirtz, S., Nikolaev, A., Kiesslich, R., Lehr, H.A., Galle, P.R., Neurath, M.F., 2005. In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy. *Gut* 54, 950–954. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.061283>.

Bocci, V., Wenzler, R.J., 1969. Metabolism of L-fucose-1-14C and of fucose glycoproteins in the rat. *Am. J. Phys.* 216, 1337–1342. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1969.216.6.1337>.

Body-Malapel, M., Djouina, M., Waxin, C., Langlois, A., Gower-Rousseau, C., Zerbib, P., Schmidt, A.-M., Desreumaux, P., Boulanger, E., Vignal, C., 2019. The RAGE signaling pathway is involved in intestinal inflammation and represents a promising

therapeutic target for inflammatory bowel diseases. *Mucosal Immunol.* 12, 468–478. <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0119-z>.

Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvallet, C., Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., Gibson, D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G.A., Janssen, S., Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kachler, B.D., Kang, K.B., Keefe, C.R., Keim, P., Kelley, S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciolk, T., Kreps, J., Langille, M.G.I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.-X., Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B.D., McDonald, D., McIver, L.J., Melnik, A.V., Metcalf, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T., Naimey, A.T., Navas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian, S.B., Pearson, T., Peoples, S.L., Petras, D., Preuss, M.L., Pruesse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A., Robeson, M.S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P.J., Ul-Hasan, S., van der Hooft, J.J.J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R., Caporaso, J.G., 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.

Chen, C., Turna, N.S., Wu, F., 2019. Risk assessment of dietary deoxynivalenol exposure in wheat products worldwide: are new codex DON guidelines adequately protective? *Trends Food Sci. Technol.* 89, 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.002>.

Coyne, M.J., Reinap, B., Lee, M.M., Comstock, L.E., 2005. Human symbionts use a host-like pathway for surface fucosylation. *Science* 307, 1778–1781.

Davis, N.M., Proctor, D.M., Holmes, S.P., Relman, D.A., Callahan, B.J., 2018. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome* 6, 226. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0605-2>.

De Ruyck, K., De Boever, M., Huybrechts, L., De Saeger, S., 2015. Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: short review. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 766, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.07.003>.

Douglas, G.M., Maffei, V.J., Zaneveld, J.R., Yurgel, S.N., Brown, J.R., Taylor, C.M., Huttenhower, C., Langille, M.G., 2020. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat. Biotechnol.* 38, 685–688.

Fernandes, A.D., Reid, J.N., Macklaim, J.M., McMurrough, T.A., Edgell, D.R., Gloor, G.B., 2014. Unifying the analysis of high-throughput sequencing datasets: characterizing RNA-seq, 16S rRNA gene sequencing and selective growth experiments by compositional data analysis. *Microbiome* 2, 1–13.

Gan, F., Lin, Z., Tang, J., Chen, X., Huang, K., 2023. Deoxynivalenol at no-observed adverse-effect levels aggravates DSS-induced colitis through the JAK2/STAT3 signaling pathway in mice. *J. Agric. Food Chem.* <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c00252>.

Garber, J.M., Hennet, T., Szymanski, C.M., 2021. Significance of fucose in intestinal health and disease. *Mol. Microbiol.* 115, 1086–1093. <https://doi.org/10.1111/mmi.14681>.

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>.

Grenier, B., Applegate, T.J., 2013. Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: meta-analysis of published experiments in animals. *Toxins* 5, 396–430. <https://doi.org/10.3390/toxins5020396>.

Hooft, J.M., Bureau, D.P., 2021. Deoxynivalenol: mechanisms of action and its effects on various terrestrial and aquatic species. *Food Chem. Toxicol.* 157, 112616. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112616>.

Kamle, M., Mahato, D.K., Gupta, A., Pandhi, S., Sharma, B., Dhawan, K., Vasundhara, Mishra, S., Kumar, M., Tripathi, A.D., 2022. Deoxynivalenol: an overview on occurrence, chemistry, biosynthesis, health effects and its detection, management, and control strategies in food and feed. *Microbiol. Res.* 13, 292–314.

Ke, J., Li, Y., Han, C., He, R., Lin, R., Qian, W., Hou, X., 2020. Fucose ameliorate intestinal inflammation through modulating the cross-talk between bile acids and gut microbiota in a chronic colitis murine model. *Inflamm. Bowel Dis.* 26, 863–873. <https://doi.org/10.1093/ibd/izaa007>.

Knutsen, H.K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L. (Ron), Nebbia, C.S., Oswald, I.P., Petersen, A., Rose, M., Roudot, A.-C., Schwerdtle, T., Vlemminckx, C., Vollmer, G., Wallace, H., Saeger, S.D., Eriksen, G.S., Farmer, P., Fremy, J.-M., Gong, Y.Y., Meyer, K., Naegeli, H., Parent-Massin, D., Rietjens, I., van Egmond, H., Altieri, A., Eskola, M., Gergelova, P., Bordajandi, L.R., Benkova, B., Dorr, B., Gkrellas, A., Gustavsson, N., van Manen, M., Edler, L., 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>.

Lavoie, H., Gagnon, J., Therrien, M., 2020. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 607–632. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0255-7>.

Lee, J.-Y., Lim, W., Park, S., Kim, J., You, S., Song, G., 2019. Deoxynivalenol induces apoptosis and disrupts cellular homeostasis through MAPK signaling pathways in

- bovine mammary epithelial cells. *Environ. Pollut.* 252, 879–887. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.001>.
- Liao, Y., Peng, Z., Chen, L., Nüssler, A.K., Liu, L., Yang, W., 2018. Deoxynivalenol, gut microbiota and immunotoxicity: a potential approach? *Food Chem. Toxicol.* 112, 342–354. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.013>.
- Liu, M., Zhang, L., Mo, Y., Li, J., Yang, J., Wang, J., Karrow, N.A., Wu, H., Sun, L., 2023. Ferroptosis is involved in deoxynivalenol-induced intestinal damage in pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 14, 29. <https://doi.org/10.1186/s40104-023-00841-4>.
- Livak, K.J., Schmittgen, P.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Mandal, S., Van Treuren, W., White, R.A., Eggesbo, M., Knight, R., Peddada, S.D., 2015. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microb. Ecol. Health Dis.* 26, 27663.
- Martin, B.D., Witten, D., Willis, A.D., 2020. Modeling microbial abundances and dysbiosis with beta-binomial regression. *Ann. Appl. Stat.* 14, 94–115. <https://doi.org/10.1214/19-aos1283>.
- Nagamine, C.M., Rogers, A.B., Fox, J.G., Schauer, D.B., 2008. Helicobacter hepaticus promotes azoxymethane-initiated colon tumorigenesis in BALB/c-IL10-deficient mice. *Int. J. Cancer* 122, 832–838. <https://doi.org/10.1002/ijc.23175>.
- 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. <https://doi.org/10.1128/mBio.00007-17>.
- Payros, D., Ménard, S., Laffitte, J., Neves, M., Tremblay-Franco, M., Luo, S., Fouché, 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.* <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02817-z>.
- Phan, T., Zhang, X.H., Rosen, S., Melstrom, L.G., 2023. P38 kinase in gastrointestinal cancers. *Cancer Gene Ther.* 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41417-023-00622-1>.
- Pickard, J.M., Chervonsky, A.V., 2015. Intestinal fucose as a mediator of host–microbe symbiosis. *J. Immunol.* 194, 5588–5593. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500395>.
- Pickard, J.M., Maurice, C.F., Kinnebrew, M.A., Abt, M.C., Schenten, D., Golovkina, T.V., Bogatyrev, S.R., Ismagilov, R.F., Pamer, E.G., Turnbaugh, P.J., Chervonsky, A.V., 2014. Rapid fucosylation of intestinal epithelium sustains host–commensal symbiosis in sickness. *Nature* 514, 638–641. <https://doi.org/10.1038/nature13823>.
- Pinton, P., Braicu, C., Nougayrede, J.-P., Laffitte, J., Taranu, I., Oswald, I.P., 2010. Deoxynivalenol impairs porcine intestinal barrier function and decreases the protein expression of Claudin-4 through a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *J. Nutr.* 140, 1956–1962. <https://doi.org/10.3945/jn.110.123919>.
- Przybylska-Gornowicz, B., Tarasiuk, M., Lewczuk, B., Prusik, M., Ziolkowska, N., Zielonka, L., Gajęcki, M., Gajęcka, M., 2015. The effects of low doses of two fusarium toxins, Zearalenone and deoxynivalenol, on the pig jejunum. A light and electron microscopic study. *Toxins* 7, 4684–4705. <https://doi.org/10.3390/toxins7114684>.
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahmad, N., 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 659–661. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF>.
- Steimle, A., Grant, E.T., Desai, M.S., 2021. Quantitative assay to detect bacterial glycan-degrading enzyme activities in mouse and human fecal samples. *STAR Protoc.* 2, 100326. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100326>.
- Tardivel, C., Aïrault, C., Djelloul, M., Guillebaud, F., Barbouche, R., Troade, J.-D., Gaige, S., Dallaporta, M., 2015. The food born mycotoxin deoxynivalenol induces low-grade inflammation in mice in the absence of observed-adverse effects. *Toxicol. Lett.* 232, 601–611.
- Tomsik, P., Soukup, T., Cermakova, E., Micuda, S., Niang, M., Sucha, L., Rezacova, M., 2011. L-rhamnose and L-fucose suppress cancer growth in mice. *Cent. Eur. J. Biol.* 6, 1–9. <https://doi.org/10.2478/s11535-010-0087-0>.
- Vignal, C., Djouina, M., Pichavant, M., Caboche, S., Waxin, C., Beury, D., Hot, D., Gower-Rousseau, C., Body-Malapel, M., 2018. Chronic ingestion of deoxynivalenol at human dietary levels impairs intestinal homeostasis and gut microbiota in mice. *Arch. Toxicol.* 92, 2327–2338. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2228-6>.
- Wang, Y., Huang, D., Chen, K.-Y., Cui, M., Wang, W., Huang, X., Awadallah, A., Li, Q., Friedman, A., Xin, W.W., Martino, L.D., Cominelli, F., Miron, A., Chan, R., Fox, J.G., Xu, Y., Shen, X., Kalady, M.F., Markowitz, S., Maillard, I., Lowe, J.B., Xin, W., Zhou, L., 2017. Fucosylation deficiency in mice leads to colitis and adenocarcinoma. *Gastroenterology* 152, 193–205.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.09.004>.
- Wang, X., Fan, M., Chu, X., Zhang, Y., Rahman, S. ur, Jiang, Y., Chen, X., Zhu, D., Feng, S., Li, Y., Wu, J., 2018. Deoxynivalenol induces toxicity and apoptosis in piglet hippocampal nerve cells via the MAPK signaling pathway. *Toxicol.* 155, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2018.09.006>.
- Wang, L., Liao, Y., Peng, Z., Chen, L., Zhang, W., Nüssler, A.K., Shi, S., Liu, L., Yang, W., 2019. Food raw materials and food production occurrences of deoxynivalenol in different regions. *Trends Food Sci. Technol.* 83, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.003>.
- Wang, S., Wu, K., Xue, D., Zhang, C., Rajput, S.A., Qi, D., 2021. Mechanism of deoxynivalenol mediated gastrointestinal toxicity: insights from mitochondrial dysfunction. *Food Chem. Toxicol.* 153, 112214.
- Wang, J., Sijs, B., Bakker, W., de Haan, L., Bouwmeester, H., 2023. Ribotoxin deoxynivalenol induces taurocholic acid malabsorption in an in vitro human intestinal model. *Toxicol. Lett.* 383, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2023.06.001>.
- Woelflingseder, L., Warth, B., Vierhellig, I., Schwartz-Zimmermann, H., Hametner, C., Nagl, V., Novak, B., Sarkanj, B., Berthiller, F., Adam, G., Marko, D., 2019. The fusarium metabolite culmorin suppresses the in vitro glucuronidation of deoxynivalenol. *Arch. Toxicol.* 93, 1729–1743. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02459-w>.
- Xiao, X., Nakatsu, G., Jin, Y., Wong, S., Yu, J., Lau, J.Y.W., 2017. Gut microbiota mediates protection against enteropathy induced by indomethacin. *Sci. Rep.* 7, 40317. <https://doi.org/10.1038/srep40317>.
- Yang, J., Wang, J., Guo, W., Ling, A., Luo, A., Liu, D., Yang, X., Zhao, Z., 2019. Toxic effects and possible mechanisms of deoxynivalenol exposure on sperm and testicular damage in BALB/c mice. *J. Agric. Food Chem.* 67, 2289–2295. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04783>.
- You, L., Zhao, Y., Kuca, K., Wang, X., Oleksak, P., Chrienova, Z., Nepovimova, E., Jacević, V., Wu, Q., Wu, W., 2021. Hypoxia, oxidative stress, and immune evasion: a trinity of the trichothecenes T-2 toxin and deoxynivalenol (DON). *Arch. Toxicol.* 95, 1899–1915. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03030-2>.
- Zaki, M.H., Vogel, P., Body-Malapel, M., Lamkanfi, M., Kanneganti, T.-D., 2010. IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. *J. Immunol.* 185, 4912–4920. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002046>.
- Zhang, Hua, Deng, X., Zhou, C., Wu, W., Zhang, Haibin, 2020. Deoxynivalenol induces inflammation in IPEC-J2 cells by activating P38 Mapk and Erk1/2. *Toxins* 12, 180. <https://doi.org/10.3390/toxins12030180>.
- Zhao, L., Zhang, L., Xu, Z., Liu, X., Chen, L., Dai, J., Karrow, N.A., Sun, L., 2021. Occurrence of aflatoxin B1, deoxynivalenol and zearalenone in feeds in China during 2018–2020. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 12, 74. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00603-0>.
- Zhou, J.-Y., Zhang, S.-W., Lin, H.-L., Gao, C.-Q., Yan, H.-C., Wang, X.-Q., 2019. Hydrolyzed wheat gluten alleviates deoxynivalenol-induced intestinal injury by promoting intestinal stem cell proliferation and differentiation via upregulation of Wnt/β-catenin signaling in mice. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 131, 110579. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110579>.

Supplementary File

Title

Low dose dietary contamination with deoxynivalenol mycotoxin exacerbates enteritis and colorectal cancer in mice

Authors names and affiliations

Madjid Djouina¹, Christophe Waxin¹, Ségolène Caboche², Karine Lecointe³, Alexander Steimle⁴, Delphine Beury², Mahesh Desai⁴, David Hot², Laurent Dubuquoy¹, David Launay¹, Cécile Vignal¹, Mathilde Body-Malapel¹

¹Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286- INFINITE - Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille, France

²University of Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US41-UAR 2014-PLBS, F-59000 Lille, France

³Inserm U1285, Univ. Lille, CHU de Lille, UMR CNRS 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, 59000 Lille, France

⁴Department of Infection and Immunity, Luxembourg Institute of Health, Esch-sur-Alzette, Luxembourg

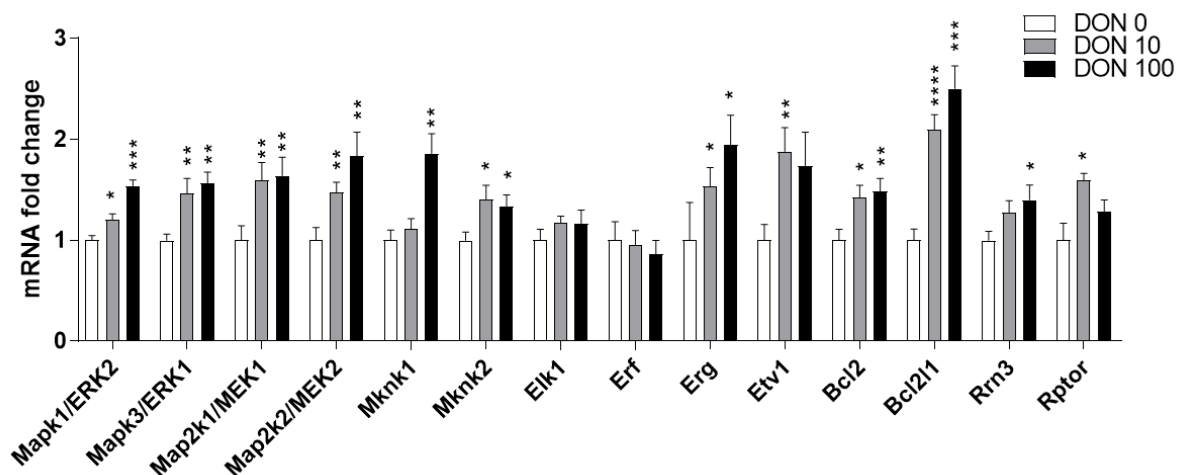


Fig. S1: Quantification of the effects of deoxynivalenol (DON) on ERK signalling pathway genes in the azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced model of colorectal cancer (0, 10, 100 µg/kg bw/day groups, n=10 per group) *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005, and ****p < 0.001 compared to the control group as determined by the Mann-Whitney U test.

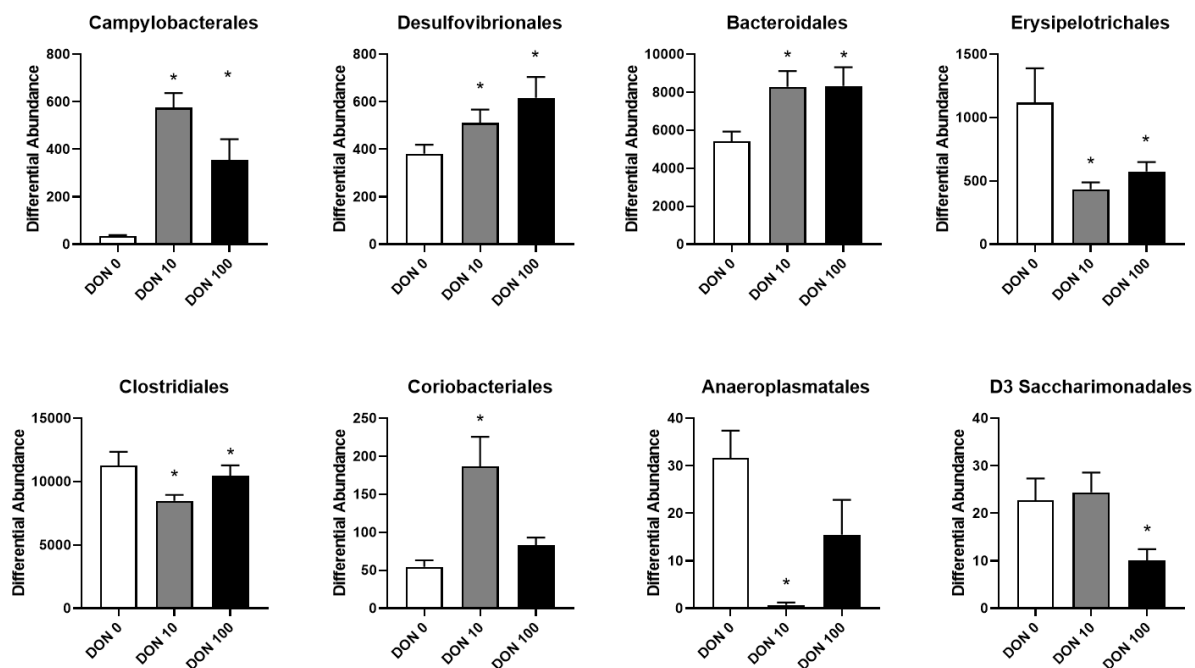


Fig. S2: Differential abundance of significantly changed bacterial orders analyzed with Corncob in mice with colorectal cancer (0, 10, and 100 μg DON/kg bw/day groups; n=10 per group). * indicates significantly different at an FDR cutoff of 0.05.

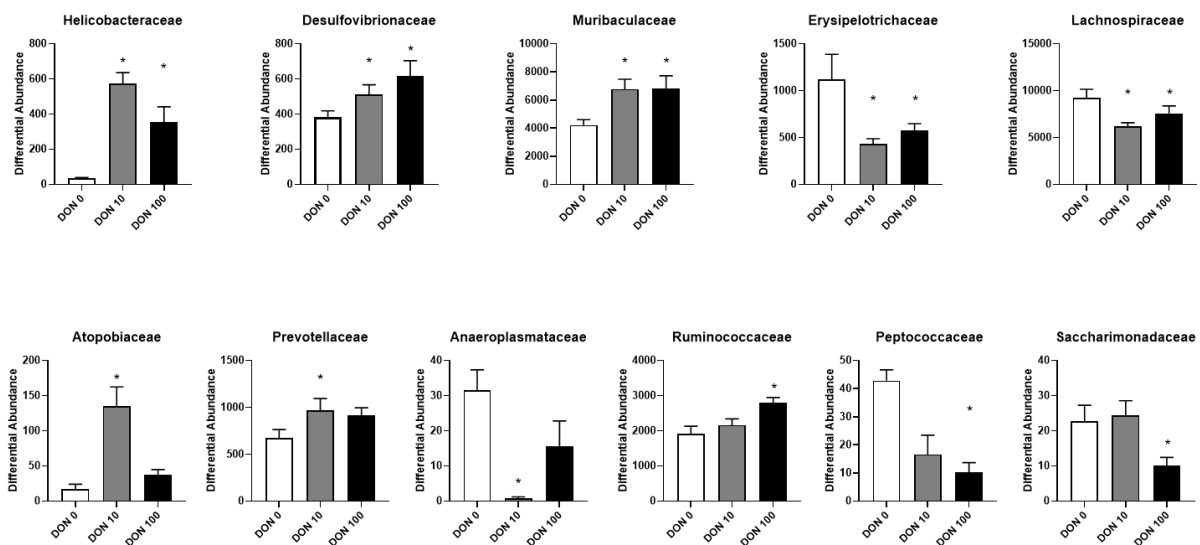


Fig. S3: Differential abundance of significantly changed bacterial families analyzed with Corncob in mice with colorectal cancer (0, 10, and 100 µg DON/kg bw/day groups; n=10 per group). * indicates significantly different at an FDR cutoff of 0.05.

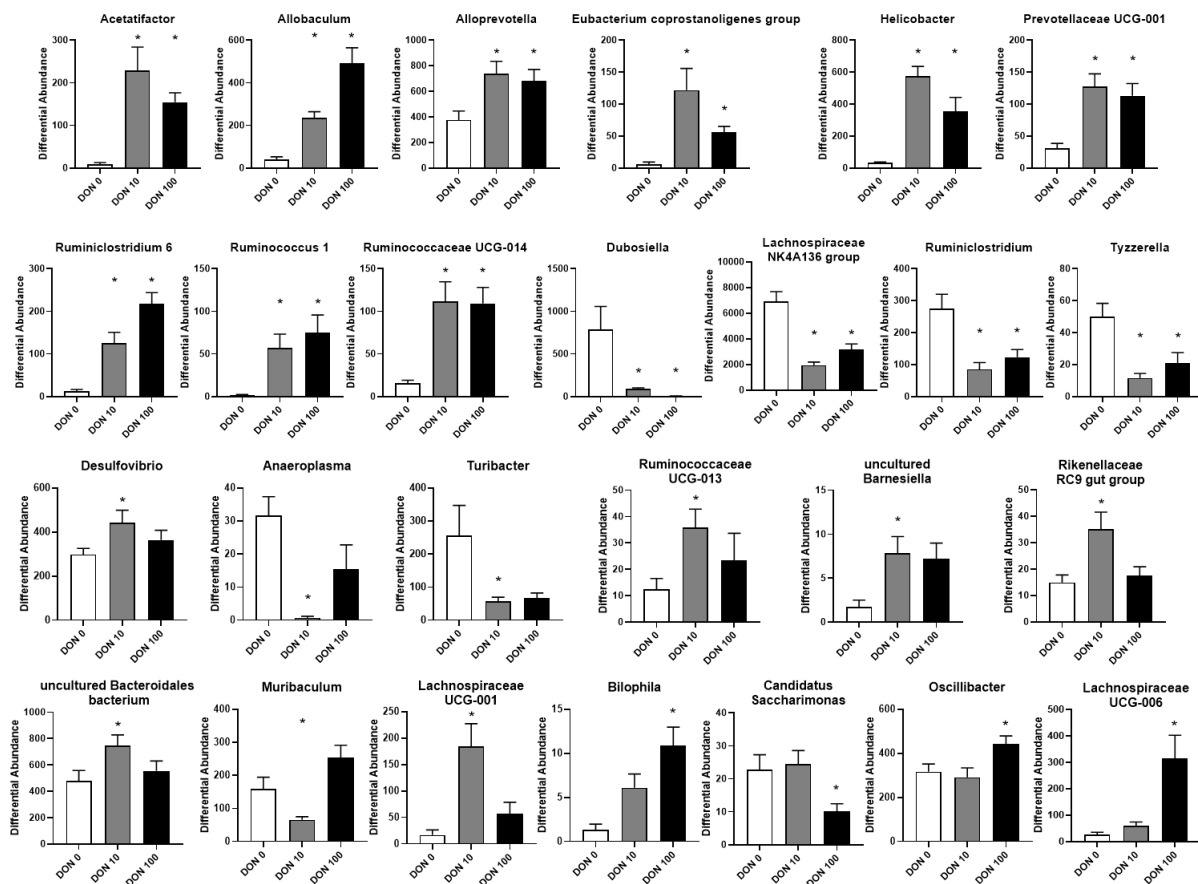


Fig. S4: Differential abundance of significantly changed bacterial genera analyzed with Corncob in mice with colorectal cancer (0, 10, and 100 µg DON/kg bw/day groups; n=10 per group). * indicates significantly different at an FDR cutoff of 0.05.

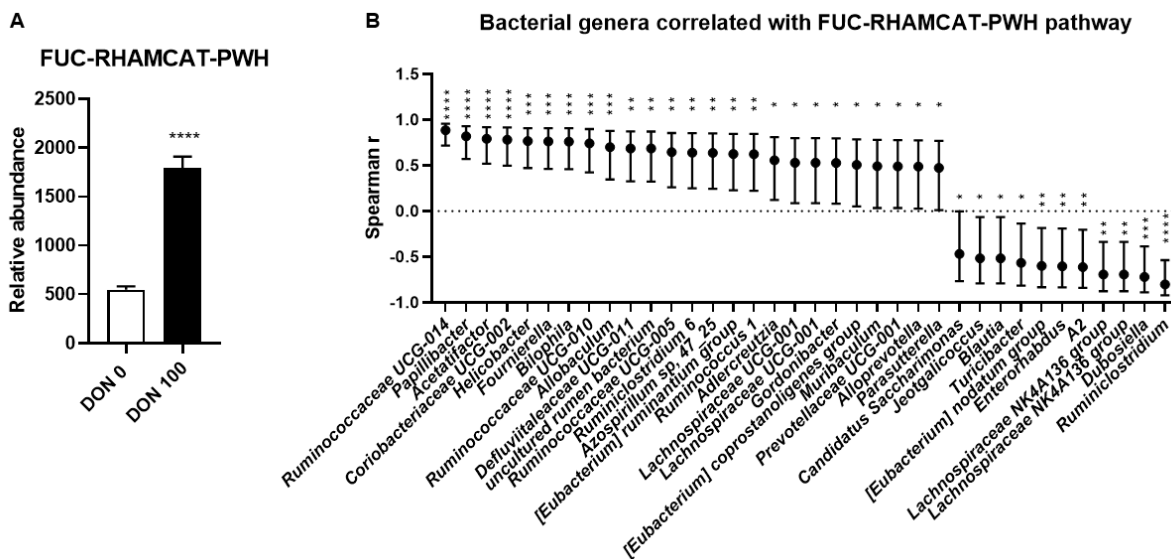


Fig. S5: Predicted Metacyc pathways in mice with colorectal cancer unexposed or exposed to deoxynivalenol (DON) (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day). (A) Relative abundance of the superpathway of fucose and rhamnose degradation enzymes. (B) Bacterial genera significantly correlated with the superpathway of fucose and rhamnose degradation enzymes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, and **** $p < 0.001$ compared to the control group as determined by the Mann-Whitney U test.

3. Conclusion de l'article 1

Une exposition de 8 jours au déoxynivalénol, à une dose équivalente à celle à laquelle les humains sont exposés via leur alimentation, a entraîné une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales dans plusieurs parties de l'intestin, notamment le duodénum, le jéjunum, l'iléon et le côlon des souris. De plus, le DON a aggravé l'entérite induite par l'indométacine et a favorisé le développement du cancer colorectal dans des modèles murins. Ces effets protumorigènes du DON étaient associés à des altérations de la diversité, de la composition et du métabolisme du fucose et du rhamnose dans le microbiote intestinal.

Cette étude améliore notre compréhension des effets néfastes du DON sur l'intestin et souligne l'importance d'accorder une attention particulière aux personnes ayant une susceptibilité intestinale. Des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux caractériser les effets de l'ingestion de DON sur le développement du cancer colorectal et évaluer leur pertinence chez l'Homme.

Chapitre 3 : Impact toxicologique des microplastiques de polyéthylène au niveau intestinal et hépatique.

1. Partie 1 : L'exposition orale aux microplastiques de polyéthylène modifie la morphologie intestinale, la réponse immunitaire et la composition du microbiote chez la souris.

1.1. Résumé de l'article 2

La présence ubiquitaire et croissante des microplastiques dans tous les compartiments de l'environnement soulève des préoccupations quant à leurs possibles effets néfastes sur la santé humaine. L'exposition humaine aux microplastiques se produit principalement par ingestion. Le polyéthylène est largement utilisé dans les sacs réutilisables et les emballages alimentaires, et l'on retrouve sa présence dans l'eau potable et les aliments. Il est également l'un des principaux polymères détectés dans les selles humaines. L'objectif de cette étude était de caractériser les effets de l'exposition intestinale aux microplastiques de PE sur l'homéostasie intestinale.

Pour ce faire, des souris ont été exposées par voie orale pendant 6 semaines à des microbilles de PE de deux tailles différentes, 36 et 116 μm , correspondant à celles retrouvées dans les selles humaines. Elles ont été administrées soit individuellement, soit en mélange, à une dose de 16 mg/kg de poids corporel/jour. Les deux tailles de microbilles de PE ont été détectées dans les selles des souris. Différents paramètres liés aux principales fonctions intestinales ont été comparés entre les groupes de souris témoins, les groupes exposés à chaque type de microbille, et les groupes exposés aux deux types de microbilles simultanément.

Les résultats ont révélé des perturbations intestinales après une exposition individuelle à chaque taille de microbille de PE, et les effets délétères les plus marqués ont été constatés chez les souris exposées aux deux types de microbilles. Au niveau histomorphologique, on a observé une augmentation de la profondeur des cryptes dans tous les tissus intestinaux. Des variations significatives de l'expression génique liée aux marqueurs épithéliaux, de perméabilité et d'inflammation ont été quantifiées. De plus, un recrutement défectueux de certaines cellules immunitaires intestinales a été observé, depuis la partie proximale de l'intestin grêle jusqu'au côlon. L'analyse métagénomique du microbiote caecal a révélé que plusieurs taxons bactériens au niveau de l'ordre étaient affectés par l'exposition aux microplastiques.

Ces résultats mettent en évidence les altérations significatives des marqueurs intestinaux cruciaux chez les souris suite à l'ingestion de microbilles de PE, soulignant ainsi la nécessité d'étudier plus en détail l'impact sur la santé de l'exposition aux microplastiques chez l'Homme.

1.2. Article 2

Environmental Research 212 (2022) 113230



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envres

Oral exposure to polyethylene microplastics alters gut morphology, immune response, and microbiota composition in mice

Madjid Djouina^a, Cécile Vignal^a, Alexandre Dehaut^b, Ségolène Caboche^c, Nell Hirt^a,
Christophe Waxin^a, Charlotte Himber^b, Delphine Beury^c, David Hot^c, Laurent Dubuquoy^a,
David Launay^a, Guillaume Duflos^b, Mathilde Body-Malapel^{b,*}

^a Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286- INFINITE - Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000, Lille, France

^b ANSES - Laboratoire de Sécurité des Aliments, 6 Boulevard Du Bassin Napoléon, 62200, Boulogne-sur-Mer, France

^c Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR2014 - US41 - PLBS-Plateformes Lilloises de Biologie & Santé, F-59000, Lille, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Microplastics. polyethylene. mice. intestinal.
inflammation. microbiota

ABSTRACT

The ubiquitous and growing presence of microplastics (MPs) in all compartments of the environment raises concerns about their possible harmful effects on human health. Human exposure to MPs occurs largely through ingestion. Polyethylene (PE) is widely employed for reusable bags and food packaging and found to be present in drinking water and food. It is also one of the major polymers detected in human stool. The aim of this study was to characterize the effects of intestinal exposure to PE MPs on gut homeostasis. Mice were orally exposed for 6 weeks to PE microbeads of 2 different sizes, 36 and 116 μm , that correspond to those found in human stool. They were administered either individually or as a mixture at a dose of 100 $\mu\text{g/g}$ of food. Both PE microbead sizes were detected in mouse stool. Different parameters related to major intestinal functions were compared between control mice, mice exposed to each type of microbead, or co-exposed to the 2 types of microbeads. Intestinal disturbances were observed after individual exposure to each size of PE microbead, and the most marked deleterious effects were found in co-exposed mice. At the histomorphological level, crypt depth was increased throughout the intestinal tissues. Significant variations of gene expression related to epithelial, permeability, and inflammatory biomarkers were quantified. Defective recruitment of some intestinal immune cells was observed from the proximal portion of the small intestine to the colon. Several bacterial taxa at the order level were found to be affected by exposure to the MPs by metagenomic analysis of cecal microbiota. These results show that ingestion of PE microbeads induces significant alterations of crucial intestinal markers in mice and underscores the need to further study the health impact of MP exposure in humans.

Funding sources

Part of this study was financially supported by the European Union European Regional Development Fund (ERDF), the French State, the French Region Hauts-de-France, and Ifremer, in the framework of the project CPER MARCO 2015–2020.

1. Introduction

Annual global plastic production has continuously risen since the 1960s and has reached about 368 million tons in 2019 (Plastics Europe, 2021). The total amount of plastic resins and fibers manufactured from

1950 through 2015 is 7800 megatons (Geyer et al., 2017). Poor management in handling of plastic waste has led to a tremendous increase in environmental dumping and ubiquitous spreading of microplastic (MP) contamination (Jambeck et al., 2015; Rillig et al., 2021). MPs are defined as small plastic particles less than 5 mm in size. MPs are purposefully manufactured for various applications, such as exfoliants (microbeads) in personal care products (Wright and Kelly, 2017). This material, along with plastic microfibers from machine-washed clothing, is directly released into the environment through municipal effluent (Wright and Kelly, 2017). MPs present in the environment may also result from fragmentation of larger plastic debris. MPs are detected in freshwater sources as well as tap and bottled water (Danopoulos et al.,

* Corresponding author. Full postal address Institute for Translational Research in Inflammation INFINITE - Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286 Faculté de Médecine - Pôle Recherche, 4ème étage Centre Place Verdun, F-59045, Lille, Cedex, France.

E-mail address: mathilde.body@univ-lille.fr (M. Body-Malapel).

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113230>

Received 11 February 2022; Received in revised form 28 March 2022; Accepted 30 March 2022

Available online 7 April 2022

0013-9351/© 2022 Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

2020). They have also been detected in seafood (fish and shellfish), salt, beer, honey, sugar, packaged meats, vegetables, and fruits (Hirt and Body-Malapel, 2020; Kedzierski et al., 2020; Oliveri Conti et al., 2020).

Humans can be exposed to MPs via dermal and inhalational routes, but the risk of exposure by ingestion is of special concern. No epidemiological study has established MP exposure as a causative risk factor for intestinal diseases. However, early experimental studies performed mostly in aquatic organisms showed that exposure to MPs lead to oxidative and inflammatory effects in the intestine and disruption of gut epithelial permeability (Hirt and Body-Malapel, 2020). Regarding polystyrene MP, oxidative stress was described in skeletal muscle, testes, ovaries and liver after oral exposure in mice (Deng et al., 2017; Li et al., 2021; Shengchen et al., 2021; Wei et al., 2022; Xie et al., 2020). Several studies have shown that polystyrene (PE) MP exposure lead to negative effects on the gut (Jin et al., 2019; Liang et al., 2021; Lu et al., 2018; Luo et al., 2019). For example, a recent study showed that ingestion of PE MPs in mice led to disturbances of gut and serum inflammatory parameters and significant modifications of the intestinal microbiome (Li et al., 2020a). This may have relevance to societal health since the presence of PE has been detected in human stool (Schwabl et al., 2019; Zhang et al., 2021).

Globally, PE is the most highly produced synthetic, petroleum-based plastic material (Plastics Europe, 2021). PE is extensively used for the manufacture of disposable containers such as bottles and bags (Bardaji et al., 2020). Since 1938, PE has widely been applied as a plastic mulch in agriculture (Wang et al., 2019). PE microbeads are also added to cosmetic products, although many countries have banned the sale of rinse-off cosmetics containing MPs (Hunt et al., 2021). As a consequence of this expansive use, inappropriate waste, and insufficient recycling, and also because PE is one of the most resistant polymers to biodegradation, there is a massive accumulation of PE in the environment (Montazer et al., 2020). For example, PE was the most highly abundant plastic polymer found in an Italian river, accounting for 40.5% of total polymers (Munari et al., 2021). PE and polypropylene are the most frequently detected plastic polymers in freshwater and tap water, and the second highest polymer components of MPs in atmospheric fallout (Hirt and Body-Malapel, 2020).

In addition to the large quantities of PE which are accumulating in the environment, PE is also detected in food. For instance, PE was the second most frequent polymer found in edible tissues of shellfish sold for human consumption (Daniel et al., 2021). The widespread use of PE in food packaging for preservation and easy handling purposes during transportation and storage also leads to migration from food packaging to food (Katsara et al., 2021). Consequently, contamination of the environment and food inevitably results in human exposure. Indeed, it has shown that PE, along with polypropylene, polyethylene terephthalate, and polystyrene, are the predominant polymers found in human stool (Schwabl et al., 2019). Moreover, Zhang et al. detected PE in 50% of stool samples collected from Chinese students (Zhang et al., 2021). Noteworthy, the size of MPs detected in human feces ranged from 20 to 800 μm . More recently, human placenta and meconium samples were screened positive for PE (Braun et al., 2021). Therefore, multiple lines of evidence show that intestinal tissues are in contact with PE MPs.

To further assess the impact of oral PE exposure, mice were exposed for 6 weeks to food spiked with commercial PE microbeads of 2 different average sizes (36 and 116 μm). Mouse stool was analyzed for the presence of the microbeads. Histological analysis and quantification of major parameters of intestinal epithelium were performed to evaluate gut effects. Intestinal immune response was assessed by measurement of cytokine levels and immunophenotyping in small intestine and colon. Finally, composition of the gut microbiome was analyzed by 16 S rRNA pyrosequencing.

2. Material and methods

2.1. Particles and chemicals

PE microbeads were acquired from Cospheric (Santa Barbara, USA). Two categories of microbeads were selected, namely red fluorescent beads (Item# UVPMS-BR-1.090 10–45 μm) and green fluorescent beads (Item# UVPMS-BG-1.00 106–125 μm). The claimed diameter sizes range from 10 to 45 μm for the red beads (RB) and 106–125 μm for the green beads (GB).

For chemicals, 10% (w/w) KOH was purchased from Chimie Plus (Vitry-sur-Seine, France), ultra-pure water was acquired from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France), and absolute ethanol from VWR (Fontenay-sous-Bois, France).

2.2. Size characterization

An Olympus SZX-16 stereomicroscope equipped with a SDFPLAPO PF 1x/0.15 objective and a UC90 camera was used to capture images by trans-illumination. A magnification of 11.5x was employed for RB and 5x for GB. Microbeads were manually measured using a 3-point circle tool with OlyVIA software (ver. 3.1, build 19,668). A total of 312 particles were measured for each category of beads on respectively 5 and 4 fields for RB and GB. Descriptive statistical data were computed using Microsoft Excel.

2.3. Identification of polymeric composition

In order to ascertain the polymeric composition, a microbead of each category was analyzed using a Spotlight™ 400 Fourier-transform infrared (FTIR) spectrometer equipped with a MCT detector coupled to a Spectrum 3 MIR spectrometer. The automatic micro Attenuated Total Reflection (μATR) module was used to acquire spectra. All the recorded spectra were obtained in the transmittance mode in the 4000–600 cm^{-1} region with 2 cm^{-1} resolution and 5 accumulations. Spectra were compared for the 3500–1200 cm^{-1} area to custom reference spectral libraries. Each identification was considered as valid from a score of >0.7 .

2.4. Mice and experimental design

All animal procedures were conducted in accordance with the institutional guidelines approved by the institutional Animal Care and Ethical Use Committee of the University of Lille (committee no.75; authorization no. CEEA2017031312157794). C57BL/6 mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) and housed under standard conditions. Female mice from 7 to 12 weeks old were used in the study. Three independent experiments were performed. Age- and sex-matched mice were used in all experiments. Mice were randomly assigned to 4 experimental groups: 1) control group, receiving control food (final n = 9); 2) RB group, receiving food spiked with 100 μg of red PE microbeads/g of food (final n = 10); 3) GB group, receiving food spiked with 100 μg of green PE microbeads/g of food (final n = 10); and 4) RB + GB group, receiving food spiked with 100 μg of red PE microbeads and 100 μg of green PE microbeads/g of food (final n = 10). The intoxication lasted 6 weeks. At necropsy, proximal and distal small intestine, cecum, and colon were sampled.

2.5. Extraction from mouse feces

As a first attempt, mouse feces exposed to both types of microbeads were gently triturated using a tweezer into the bottom of a Petri dish filled with water and observed using an Olympus SZX-16 stereomicroscope with a SDFPLAPO PF 1.6x/0.15 objective.

After feasibility tests, extraction of microbeads from mouse feces was carried out by adapting the method of Dehaut et al. (2016), following

the temperature decrease proposed by Treilles et al. (2020) (Dehaut et al., 2016; Treilles et al., 2020). Feces were analyzed individually. For each of the 4 conditions, $n = 8$ feces were weighed on a 0.0001 g sensitivity Sartorius ME215-P analytical balance (Dourdan, France) and placed in a glass beaker. The average mass of feces was 48.1 ± 29.3 mg. After weighing, 10 mL of 10% KOH (m/m) was poured in the beakers and a 2.5 cm magnetic stirrer was added. For digestion, beakers were placed on two multiple stirrers (MIXDrive 6 HT; 2mag, Munich, Germany) with an agitation of 200 rpm for 4 h in a Binder BD 240 incubator (Tüttlingen, Germany) with a temperature of 39.9 ± 1.3 °C. Once digested, solutions were filtered with a vacuum system onto a 90 mm GF/A 1.6 μ m glass fiber filter set between a VWR 1100 mL funnel and a sintered glass filter holder (Fontenay-sous-Bois, France). The rinsing protocol was carefully performed to increase recovery of the particles on the filter. This protocol consisted of a three-step rinsing using ultra-pure water/70% (v/v) ethanol/ultra-pure water that was applied on the empty beaker, the empty funnel attached to the filter holder, and a final rinse of the contact area between the funnel and the filter holder.

For a positive control (PC), 10 samples with particles were processed in the same conditions for each batch of digestion. This PC was composed of 10 GB for mice fed with GB, 10 RB for those fed with RB, and 5 GB and 5 RB for mice fed with the mixture of microbeads.

2.6. Histological analysis

At necropsy, tissues were fixed in 4% paraformaldehyde overnight, processed, and embedded in paraffin wax by standard techniques. Serial histological sections of 4 μ m thickness were cut, deparaffinized, rehydrated, and stained with Alcian blue and periodic acid-Schiff (AB-PAS). Epithelial area in the colon, villus height, and crypt depth in the proximal and distal small intestine were measured using ImageJ software. For this study, at least 100 well-oriented mucosa, villi, and crypts were measured in at least 5 individual mice from each group. AB-PAS-positive cells were counted under a light microscope (Leica DM5500B).

2.7. Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR)

Small intestinal and colonic tissue samples were homogenized with ceramic beads using Precellys Lysing Equipment (Bertin Technologies, Montigny-le Bretonneux, France). Total RNA was extracted with the NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). Transcript levels of genes were quantified with the StepOne™ Real-Time PCR system using a SYBR Green PCR master mix (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). The primer sequences were designed using Primer Express 3 (Thermo Fisher Scientific) and are available upon request. Melting curve analyses were performed for each sample and gene to confirm the specificity of the amplification. The relative expression of each target gene was normalized to the relative expression of the *Pob2a* gene. Quantification of target gene expression was based on the comparative cycle threshold (Ct) value. The fold changes in the target genes were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

2.8. Cell isolation and flow cytometry

At necropsy, the colon and small intestine were harvested and cleaned of fat residue and Peyer's patches for the small intestine. Tissues were open longitudinally, cut into small pieces, and rinsed in cold PBS containing 2% SVF. Pieces were then incubated in predigestion buffer containing EDTA and DTT (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 30 min at 37 °C under agitation. Pieces were then filtered through a 100 μ m cell strainer and incubated in digestion solution containing collagenase type 1 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 45 min at 37 °C under agitation. Cell solution was then passed through a 100 μ m cell strainer. Supernatants from the predigestion and digestion steps were then combined and centrifuged. The pellet was resuspended in 44% Percoll (GE Healthcare, Buc, France) and carefully overlaid on a 67% Percoll

solution. The Percoll gradient was centrifuged for 20 min and immune cells were recovered from the white ring visible at the interphase of the 2 Percoll solutions. Cells were resuspended in PBS containing a marker of cell viability (Fixable Viability Stain 780; BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) for 10 min to discriminate viable from non-viable cells in FACS analysis. Cells were then incubated with Fc Block (anti-CD16/CD32; BD Biosciences) for 10 min and then with antibodies in FACS buffer (Brilliant Stain Buffer; BD Biosciences) for 30 min. Antibodies against CD11c (V450; BD Biosciences), CD45 (BV570; Biolegend, San Diego, USA), LY-6G (BV605; BD Biosciences), CD64 (PE; BD Biosciences), I-A/I-E (PE/Dazzle 594; Biolegend), CD11b (BB700; BD Biosciences), CX3CR1 (PE/Cy7; Biolegend), Ly-6C (APC; BD Biosciences), CD4 (PE-Cy7; BD Biosciences), and CD8a (AF532; eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) were used along with the isotype control antibodies V450 Hamster IgG1 (BD Biosciences), BV570 Rat IgG2b (Biolegend), BV605 Rat IgG2a (BD Biosciences), PE Mouse IgG1 (BD Biosciences), PE/Dazzle 594 Rat IgG2b (Biolegend), BB700 Rat IgG2a (BD Biosciences), PE/Cy7 Mouse IgG2a (Biolegend), APC Rat IgM (BD Biosciences), PE-Cy7 Rat IgG2a (BD Biosciences), and AF532 Rat IgG2a (eBioscience). After washing, cells were analyzed by flow cytometry (Sony SP6800). The generated data were analyzed using FlowJo software (ver. 10.7.1; TreeStar, Stanford, USA).

2.9. Bacterial DNA extraction and Illumina MiSeq sequencing

Genomic DNA was extracted from cecal content using the DNA stool kit (Macherey Nagel, Hoerdt, France). The quantity and purity of DNA (expressed as the ratio of absorbance at 260 and 280 nm) were assessed using a NanoDrop® spectrophotometer (Ozyme, Saint-Cyr-l'Ecole, France). The sequencing library was generated by amplifying the V3-V4 region of the bacterial 16 S-rRNA gene using 16 S rRNA amplicon generation for MiSeq with the primers Bact-0341 (CCTACGGGNGGCWGCAG) and Bact-0785 (GACTACHVGGGTATCTAATCC). Individual samples were barcoded, pooled to construct the sequencing library, and sequenced using an Illumina MiSeq system (Illumina, San Diego, USA) to generate paired-end 2×300 bp reads.

2.10. Analysis of sequencing data

Bioinformatic analyses were performed using the QIIME2 pipeline (ver. 2020.2) (Bolyen et al., 2019). The Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 (DADA-2) plug-in in QIIME2 was used to filter, dereplicate, identify chimeric sequences, and merge reads to obtain the set of Amplicon Sequence Variants (ASVs) for each sample (Callahan et al., 2016). Then the representative sequences were picked for each ASV. The classify-sklearn plug-in in QIIME2, with the SILVA database (ver. 132), was applied to assign a taxonomic annotation to each representative ASV sequence. In the next step, ASVs identified as eukaryotic contamination (3 ASVs; 12 reads) and external contamination, identified with the decontam package (3 ASVs; 3119 reads), were filtered out (Davis et al., 2018). Diversity metrics (α and β) were obtained with the QIIME2 core-metrics-phylogenetic plug-in, with p-sampling depth parameter fixed to 13,781 reads which corresponded to the total frequency that each sample should be rarefied to prior to computing diversity metrics. This sampling depth allowed retention of >61% of reads and the discarding of only one sample. Tests for differential relative abundance were performed with corncob at the order, family, and genus levels (Martin et al., 2020).

2.11. Statistics

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). The statistical significance of differences between experimental groups was calculated using the Mann-Whitney nonparametric *U* test (GraphPad Prism software, USA). Statistical significance was defined as $p < 0.05$. For all experiments, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, and

*** $p < 0.001$ vs control group.

3. Results

3.1. Characterization of microbeads

For size characterization of RB, it was observed that the majority of beads, 94.2%, were included in the size range defined by the supplier (10–45 μm) (Fig. 1A). The percentage was lower for GB, in which only 83.7% of spheres were in the claimed size range (100–125 μm), and 14.1% of particles were lower than 106 μm (Fig. 1B). The median size of spheres was 36 and 116 μm for RB and GB, respectively. This indicates that the size distribution is rather shifted towards the largest particle sizes in the range for each of the bead references. Overall, the size distributions of RB and GB were significantly different (Fig. 1C, $p < 0.001$).

Based on observation, the large majority of particles were spherical single chimeric particles for both RB and GB. Some minute polymeric debris, ca. 40, irregular shaped microparticles with size below 10 μm were also observed on the 5 fields of RB.

3.2. Identification of polymeric composition

Based on FTIR spectra, the respective top scores obtained for GB and RB were 0.9593 and 0.95889, matching with PE, without signal for other polymers, confirming that microbeads are composed of pure PE polymer (Fig. 1D and E).

3.3. Study of ingested microbeads

3.3.1. Direct observation of mouse feces

During our first attempt to visualize the presence of both sizes of

microbeads in mouse stool, both intact and fragmented microbeads were observed (Fig. 1F).

3.3.2. Count and observation after alkaline hydrolysis

Regarding the PCs used during this experiment, different results were obtained depending on the type of beads. Mostly, GB were recovered with acceptable results (Table 1). In one case, 2 beads proved to be fragmented. RB were more difficult to be recovered.

For fecal analysis (Table 2), neither GB nor RB was observed in the control mice. For digested feces, observed after exposure of mice to green, red, or a mixture of both types of beads, all samples contained beads except for a single feces of mouse treated with GB.

The microbeads were present as both intact and fragmented particles but counts were variable depending on feces, and this heterogeneity was independent of the fecal mass (Table 3). Higher counts were recorded for RB, which was an expected result since food was supplemented with PE MPs based on mass quantities. There was a tendency to have a higher proportion of fragmented GB and intact RB in comparison with their respective counterparts.

Table 1

Counts of intact and fragmented beads in the positive controls.

| | Counts ^a |
|-------------|-----------------------|
| Green beads | 7/10 |
| Red beads | 7/10 |
| Mixture | 5/5 (GB) ^b |
| | 2/5 (RB) |

^a (GB) Green beads (RB) Red beads.

^b 2 out of the 5 beads were observed as fragments.

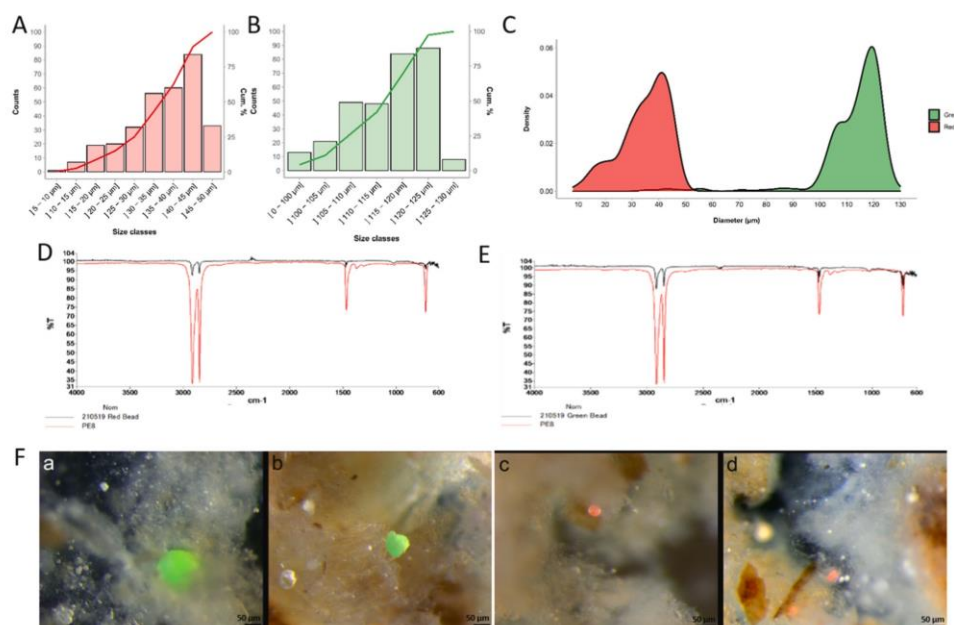


Fig. 1. Characterization of polyethylene (PE) microbeads. (A–B) Histograms of size distributions and cumulative percentage of red beads (A) and green beads (B) after measurement of 312 particles for each bead category. (C) The combined density plot. (D–E) FTIR profiles obtained for red bead (D) and green bead (E) from 4000 to 600 cm^{-1} . For each spectrum the red FTIR profile of PE from a custom library is superimposed. (F) Observation of intact (a) and fragmented (b) green beads and intact (c) and fragmented (d) red beads in mouse stool. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 2
Count data of intact and fragmented beads observed in the samples (n = 8) for the 4 exposure treatments.

| | ^a | Minimum | Maximum | Range | Mean | Std.Error of Mean |
|--------------------|--------------|---------|---------|-------|------|-------------------|
| Green beads | I | 0 | 5 | 5 | 2.9 | 0.69 |
| | F | 0 | 20 | 20 | 4.9 | 2.3 |
| Red beads | I | 12 | 135 | 123 | 64 | 15 |
| | F | 15 | 88 | 73 | 40 | 11 |
| Mixture | IG | 1 | 5 | 4 | 2.8 | 0.53 |
| | IR | 23 | 83 | 60 | 46 | 7.5 |
| | FG | 2 | 44 | 42 | 17 | 5.5 |
| | FR | 8 | 173 | 165 | 55 | 19 |
| Controls | I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | F | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

^a I: intact beads, F: fragmented beads, IG: intact green beads, IR: intact red beads, FG: fragmented green beads, FR: fragmented red beads.

Table 3
Data on concentrations expressed as number per mg of feces for intact and fragmented beads observed in the samples (n = 8) for the 4 exposure treatments.

| | ^a | Minimum | Maximum | Range | Mean | Std.Error of Mean |
|--------------------|--------------|---------|---------|-------|-------|-------------------|
| Green beads | I | 0.0 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0.033 |
| | F | 0.0 | 0.5 | 0.5 | 0.15 | 0.063 |
| Red beads | I | 0.2 | 2.9 | 2.7 | 1.6 | 0.29 |
| | F | 0.3 | 1.7 | 1.4 | 1.0 | 0.19 |
| Mixture | IG | 0.0 | 0.2 | 0.2 | 0.088 | 0.030 |
| | IR | 0.6 | 3.7 | 3.1 | 1.4 | 0.38 |
| | FG | 0.1 | 0.8 | 0.7 | 0.41 | 0.11 |
| | FR | 0.2 | 3.8 | 3.6 | 1.4 | 0.40 |
| Controls | I | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | F | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

^a I: intact beads, F: fragmented beads, IG: intact green beads, IR: intact red beads, FG: fragmented green beads, FR: fragmented red beads.

3.4. Effects of PE microbead exposure on proximal small intestine

After 6 weeks of exposure, weight gain was similar between the 4 groups of mice (112.2 ± 2.8% for CT, 112.3 ± 2.6% for RB, 111.5 ± 1.7% for GB, and 112.6 ± 2.6% for RB + GB, $p = 0.9$ vs CT group). In order to determine if exposure to PE induces morphological alterations of the proximal small intestine, morphometric analyses of this tissue were performed. The measurement of the villus length did not show significant changes in any of the groups (Fig. 2A and B). The crypt depth was increased in the mice exposed to GB ($p = 0.006$) and RB + GB ($p = 0.002$) compared to control mice (Fig. 2A and B). Moreover, the villus/crypt ratio was decreased in the 2 groups of mice exposed to PE individually ($p = 0.03$ for RB and $p = 0.0006$ for GB) and in the group of mice exposed to the mixture of the 2 PE types ($p = 0.0003$; Fig. 2C). The AB-PAS-positive area, i.e., the mucin-positive area, was lower in mice exposed to GB ($p = 0.007$) and in mice exposed to RB + GB ($p = 0.0002$; Fig. 2A, D). The transcript levels of the major secretory protein mucin-2 (*Muc2*) was significantly decreased in RB- and GB-exposed mice ($p = 0.001$ and $p = 0.04$, respectively; Fig. 2E). Expression levels of major markers of epithelial cell types were also quantified. The absorptive epithelial cell marker villin-1 (*Vil1*) was decreased in RB- and GB-exposed mice ($p = 0.001$ and $p = 0.04$, respectively; Fig. 2E). The enteroendocrine cell marker chromogranin-A (*Chga*) was down-regulated in GB- ($p = 0.001$) and RB + GB-exposed mice ($p = 0.001$; Fig. 2E). The stem cell marker leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5 (*Lgr5*) did not vary (Fig. 2E). The levels of the tight junction-related genes occludin (*Ocln*) and junctional adhesion molecule A (*F11r*) were not modified in PE-exposed mice (Fig. 2F). Assessment of the inflammatory status of the proximal small intestine showed that the

mRNA levels of tumor necrosis factor alpha (*Tnf*), interferon gamma (*Ifng*), interleukin-6 (*Il6*), and interleukin-1 beta (*Il1b*) proinflammatory cytokines were not significantly different between the PE-exposed and the control mice (Fig. 2G). Immunophenotyping showed significant variations of the frequency of 4 immune populations: CD4⁺ T lymphocytes ($p = 0.03$), CD8⁺ T lymphocytes ($p = 0.03$), dendritic cells ($p = 0.04$), and inflammatory monocytes ($p = 0.004$) were reduced in mice exposed to the mixture of the 2 PE microbeads (Fig. 2H).

3.5. Effects of PE microbead exposure on distal small intestine

For the distal small intestine, an increase of crypt depth was found in RB- ($p = 0.01$) and RB + GB-exposed mice ($p = 0.003$; Fig. 3A and B). The villus/crypt ratio was significantly decreased in the 3 groups of PE-exposed mice ($p = 0.006$, $p = 0.03$, and $p < 0.0001$ for RB, GB, and RB + GB, respectively; Fig. 3C). The mucin area was not significantly modified in any of the PE-exposed groups, as well as *Muc2* transcript expression (Fig. 3A, D, E). In the distal small intestine, a significant increase of *Vil1*, *Chga*, and *Lgr5* was also measured in RB + GB-exposed mice compared to control mice ($p = 0.003$ for the 3 targets; Fig. 3E). *Ocln* and *F11r* mRNA levels tended to decrease in the PE-exposed mice, with a significant decrease of *Ocln* observed in the RB + GB-exposed mice compared to control mice ($p = 0.04$; Fig. 3F). Furthermore, increasing trends of *Tnf*, *Ifng* and *Il1b* were observed in the PE-exposed group, with a significant rise of *Ifng* in GB-exposed mice compared to control mice ($p = 0.03$; Fig. 3G). The levels of *Il6* tended to decrease in PE-exposed mice, with a significant diminution observed in the mice exposed to both PE sizes ($p = 0.01$; Fig. 3G). The frequency of NK cells was increased in distal small intestine of mice exposed to the mixture of PE MPs ($p = 0.05$; Fig. 3H).

3.6. Effects of PE microbead exposure on colon

In colon, the mucosal surface area tended to increase in RB- and GB-exposed mice, and a significant enhancement of the mucosal surface was observed in RB + GB-exposed mice compared to control mice ($p = 0.03$; Fig. 4A and B). The mucin-positive area was also significantly increased in the RB + GB-exposed mice compared to control mice ($p = 0.003$; Fig. 4A, C). Accordingly, *Muc2* mRNA levels were also significantly upregulated between these 2 groups ($p = 0.0003$; Fig. 4D). The expression of *Lgr5* was enhanced in the GB group ($p = 0.02$; Fig. 4D). The transcripts of *Vil1* and *Chga* were upregulated in colon of GB ($p = 0.02$ and $p = 0.004$, respectively) and RB + GB groups ($p = 0.001$ for both genes; Fig. 4D). These 2 groups also presented a significant over-expression of tight junction-related genes *Ocln* and *F11r* (respectively $p = 0.001$, $p = 0.002$ for GB group and $p = 0.008$, $p = 0.003$ for RB + GB group). For inflammatory cytokines, an upregulation of *Tnf*, *Ifng*, *Il6*, and *Il1b* transcripts was observed in the colon of mice exposed to the mixture of PE compared to control mice, although only *Ifng* and *Il6* reached a significant level ($p = 0.002$ for *Ifng*, $p = 0.005$ for *Il6*; Fig. 4F). *Ifng* expression was induced by the exposure to GB MPs ($p = 0.046$). Furthermore, the relative abundance of polynuclear neutrophils was higher in the GB-exposed mice ($p = 0.02$), and the abundance of anti-inflammatory macrophages was lower in both GB- and RB + GB-exposed mice ($p = 0.05$; Fig. 4G).

3.7. Effects of PE microbead exposure on microbiome composition

To assess the impact of PE exposure on the mouse microbiome, V3-V4 amplicons of 16 S rRNA genes were sequenced in the cecal content. Exposure to PE did not significantly affect α diversity (Chao1 diversity index; Fig. 5A). The unweighted-UniFrac index showed a significant decrease of β diversity in GB-exposed mice compared to control mice ($p = 0.02$; Fig. 5B). Taxonomic assignment at the phylum level of ASVs, with each color representing an individual bacterial phylum, is shown in Fig. 5C. As expected, *Bacteroidetes* and *Firmicutes* represented the 2 predominant phyla. The effect of PE exposure was assessed on the

M. Djouina et al.

Environmental Research 212 (2022) 113230

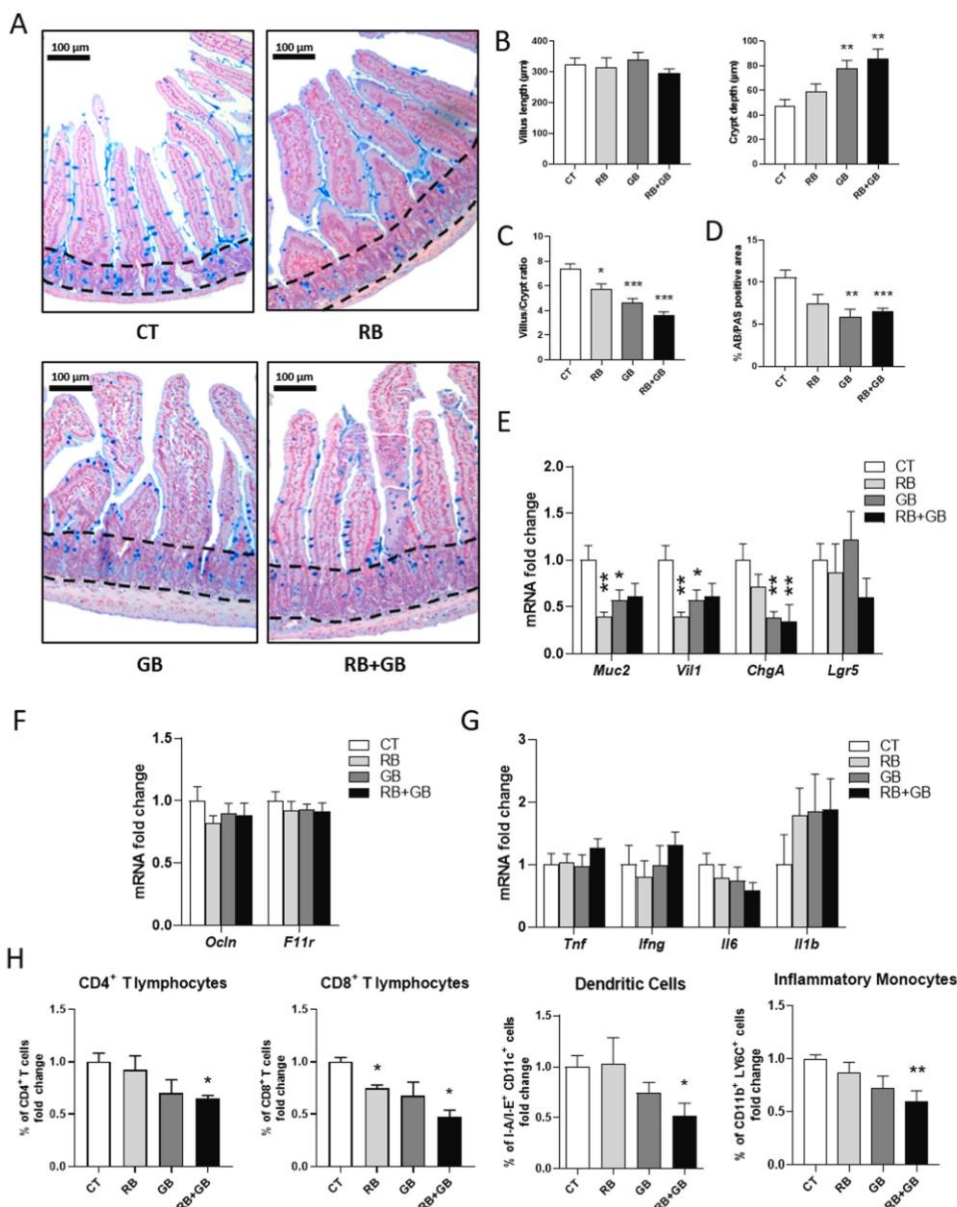


Fig. 2. Effects of polyethylene (PE) exposure on proximal small intestine epithelium histomorphology and immune response. Mice were exposed to food spiked with 100 µg/g of PE microbeads (red beads (RB), green beads (GB), or RB + GB; n = 10/group) or control food (CT; n = 9) for 6 weeks. (A) Representative pictures of proximal small intestine sections stained with AB-PAS. (B) Villus length and crypt depth. (C) Villus/crypt ratio. (D) Percentage of AB-PAS-positive area. (E) mRNA quantification of markers of intestinal cells *Muc2*, *Vil1*, *Chga*, and *Lgr5*. (F) mRNA quantification of tight junction genes *Ocln* and *F11r*. (G) mRNA quantification of inflammatory cytokines *Tnf*, *Ifng*, *Il6*, and *Il1b*. (H) Percentage of significantly changed immune populations: CD4⁺ T lymphocytes, CD8⁺ T lymphocytes, dendritic cells, and inflammatory monocytes. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs control group as determined by the Mann-Whitney *U* test. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

abundance of bacterial orders. Several bacteria showed significant changes in relative abundance between the 3 PE-exposed groups and the control group (Fig. 5D). The GB-exposed mice had more abundant Erysipelotrichaceae bacteria ($p = 0.04$). Both RB- and GB-exposed mice

had reduced amounts of Verrucomicrobiales ($p = 0.04$ for both groups). By contrast, the relative abundance of Gastranaerophilales was heightened in these 2 PE-exposed groups ($p = 0.03$ for RB- and $p = 0.04$ for GB-exposed mice). An increasing trend for Gastranaerophilales abundance

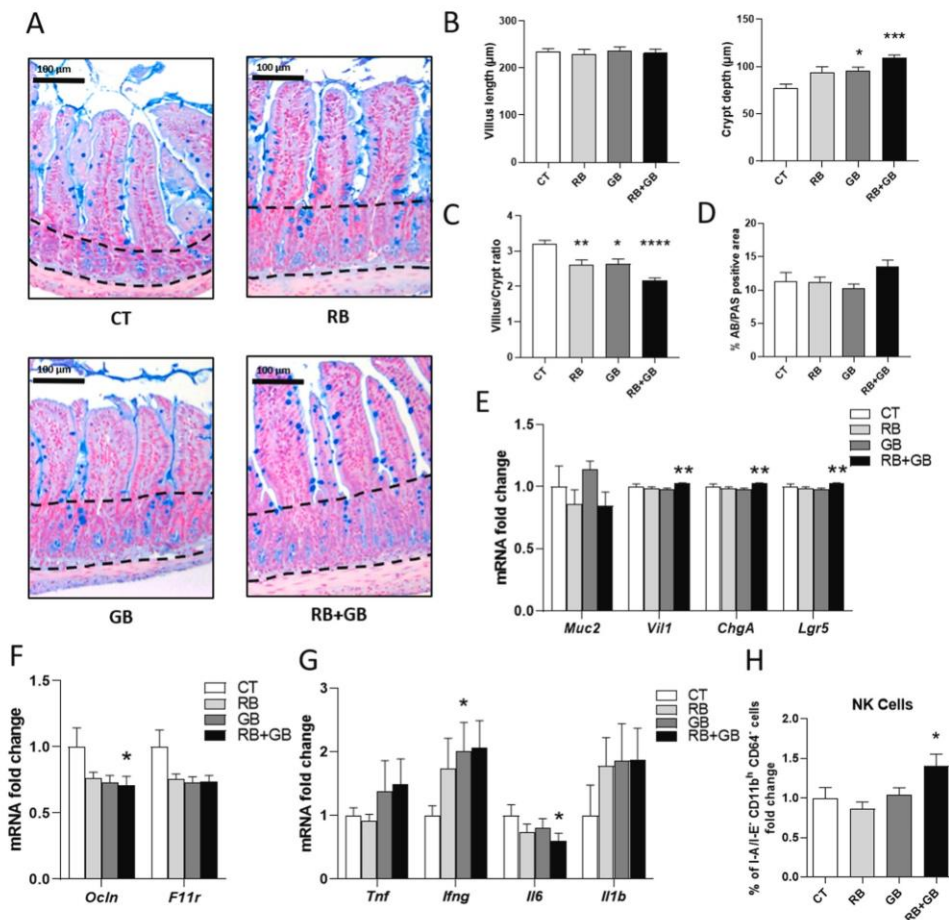


Fig. 3. Effects of polyethylene (PE) exposure on distal small intestine epithelium histomorphology and immune response. Mice were exposed to food spiked with 100 µg/g of PE microbeads (red beads (RB), green beads (GB), or RB + GB; n = 10/group) or control food (CT; n = 9) for 6 weeks. (A) Representative pictures of distal small intestine sections stained with AB-PAS. (B) Villus length and crypt depth. (C) Villus/crypt ratio. (D) Percentage of AB-PAS-positive area. (E) mRNA quantification of markers of intestinal cells *Muc2*, *Vil1*, *Chga*, and *Lgr5*. (F) mRNA quantification of tight junction genes *Ocln* and *F11r*. (G) mRNA quantification of inflammatory cytokines *Tnf*, *Il6*, and *Il1b*. (H) Percentage of the significantly changed immune population of NK cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, and **** $p < 0.001$ vs control group as determined by the Mann-Whitney *U* test. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

was observed in the RB + GB-exposed group ($p = 0.06$). Lastly, the abundance of Rhodospirillales and Lactobacillales was shown to be increased and decreased, respectively, in RB + GB-exposed mice compared to control mice ($p = 0.02$ for both orders).

4. Discussion

The aim of this study was to assess whether the presence of PE in intestinal lumen can induce host disturbances. We studied the effects of oral exposure to PE of 2 different average sizes (36 and 116 µm), which present about a 3-fold difference in diameter. These sizes were chosen because they reproduce what has been detected in human feces (Zhang et al., 2021). The concentration of PE was 100 µg/g of food. Assuming the food intake of C57BL/6 mice is 5 g of food/30 g body weight (bw)/day, the daily intake of PE was approximately 16.66 mg PE/kg bw/day (Bachmanov et al., 2002). Using the usual interspecies (animal to human) uncertainty factor of 10, this concentration can be

extrapolated as 1.66 mg PE/kg bw/day (Dourson et al., 2021). Recently, human ingestion of MPs has been estimated between 0.1 and 5 g weekly, or 0.2–10.2 mg/kg bw/day, for a 70 kg adult (Senathirajah et al., 2021). Therefore, the concentration of PE tested was chosen to reflect a realistic human ingestion range of MP. We also tested MP exposure either individually or as a mixture in order to address the issue of potential additive, inhibitory, or synergistic effects.

Our initial analyses confirmed that RB and GB were detected in mouse stool. In the experiment with beads of the positive control, the recovery rate was close to 80% despite the care undertaken to rinse all glassware used for the isolation process with both ultra-pure water and 70% (w/w) ethanol solution. This incomplete recovery may be explained by a stickiness phenomenon resulting from interactions between glass and the beads. Our analyses also showed a trend of microbead fragmentation in mouse stool. Based on the direct observation of stool without digestion and beads of the positive control, it appears that fragmentation of beads might have occurred during the

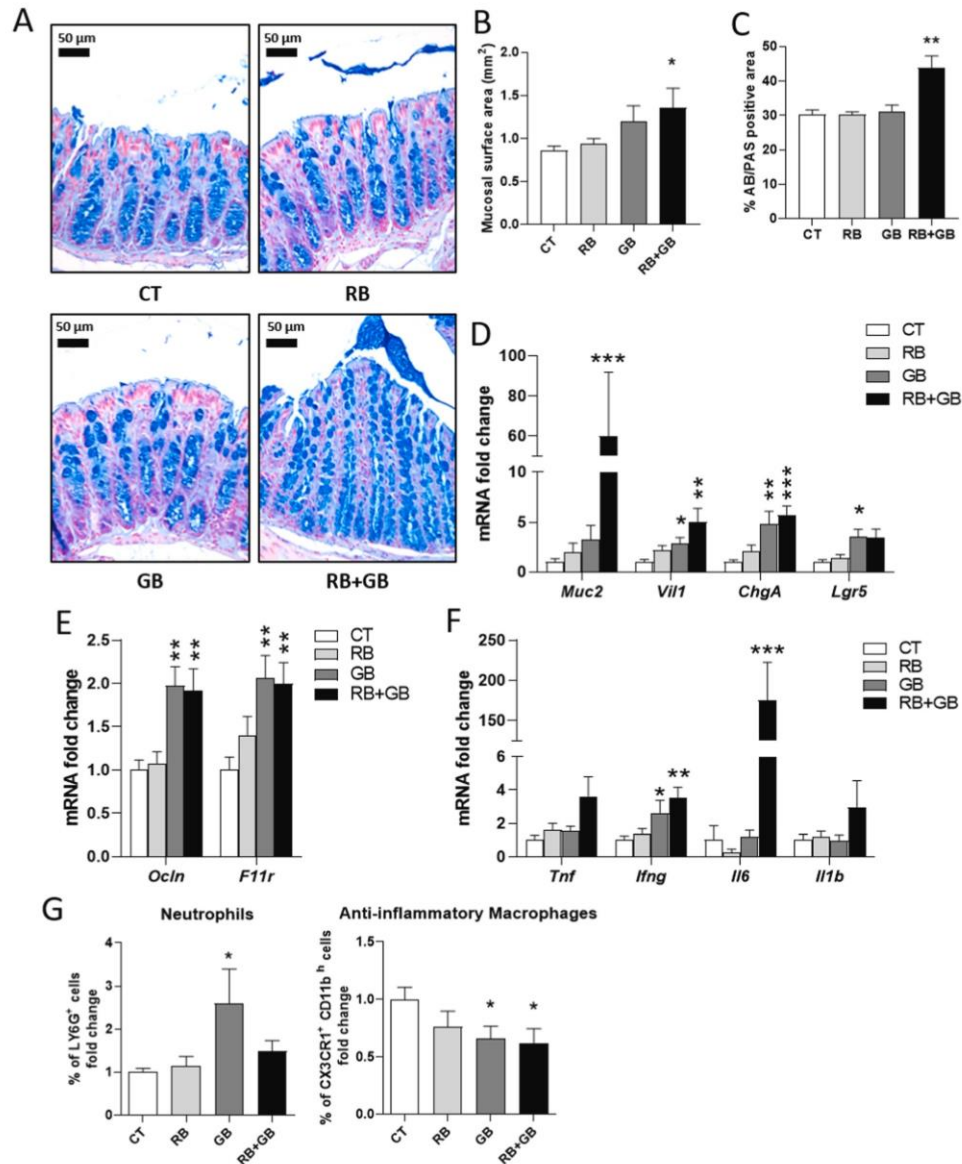


Fig. 4. Effects of polyethylene (PE) exposure on colon epithelium histomorphology and immune response. Mice were exposed to food contaminated with 100 µg/g of PE microbeads (red beads (RB), green beads (GB), or RB + GB; n = 10/group) or control food (CT; n = 9) for 6 weeks. (A) Representative pictures of colon sections stained with AB-PAS. (B) Mucosal surface area. (C) Percentage of AB-PAS-positive area. (D) mRNA quantification of markers of intestinal cells *Muc2*, *Vil1*, *Chga*, and *Lgr5*. (E) mRNA quantification of tight junction genes *Ocln* and *F11r*. (F) mRNA quantification of inflammatory cytokines *Tnf*, *Il1g*, *Il6*, and *Il1b*. (G) Percentage of significantly changed immune populations: polymorphonuclear neutrophils and anti-inflammatory macrophages. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.005 vs control group as determined by the Mann-Whitney *U* test. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

ingestion and digestion by mice. A second possibility is that fragmentation of microbeads occurred during the extraction process. Indeed, for the latter, we observed in a previous experiment that depending on agitation speeds, microbeads could become fragmented due to the mechanical action of the vortexer and/or possible fragility of the beads.

Exposure to the smaller RB microbeads had no effect in the colon, but

induced some significant modifications in proximal and small intestine. The most notable effect of RB exposure was the decrease of villus/crypt ratio both in proximal and distal small intestine. The villus/crypt ratio was also reduced after exposure to GB alone or with the mixture of both MPs. These ultrastructural changes were primarily due to crypt depth enhancement throughout the small intestine and were not associated

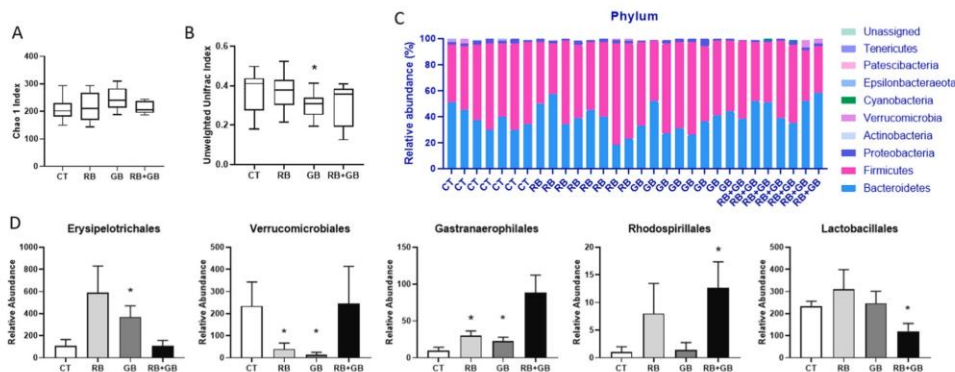


Fig. 5. Effects of polyethylene (PE) exposure on the gut microbiome. Mice were exposed to food spiked with 100 µg/g of PE microbeads (red beads (RB), green beads (GB), or RB + GB; n = 7–8/group) or control food (CT; n = 7) for 6 weeks. (A) Chao1 α diversity index. (B) Unweighted UniFrac β diversity index; *p < 0.05 as determined by pairwise PERMANOVA. (C) Overview of the relative abundance of gut bacteria depicted at the phylum level. (D) Differential abundance of significantly changed bacterial orders. *p < 0.05 vs control group as determined by Corncob test. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

with villus atrophy, and therefore reflect hypertrophic crypt formation. The hyperproliferation of the crypt compartment can contribute to intestinal tumorigenesis and therefore deserves further investigation (Murray et al., 2021). RB exposure also downregulated mucin-2 and villin-1 gene expression and decreased recruitment of CD8⁺ T lymphocytes to the proximal small intestine.

The larger microbeads, GB, tended to induce more effects in the intestinal tract than RB. Exposure to GB affected 3 parts of the intestine, with a greater impact on colon. At the histological level, we did not observe any significant difference between GB-exposed mice and control mice, showing that it did not induce severe damage in the colon. Significant disturbances were visible by more sensitive methods such as quantitative RT-PCR and flow cytometry. The proportion of neutrophils and the expression of *Vill1*, *Chga*, *Lgr5*, *Ocln*, *F11r*, and *Ifng* were enhanced, and the recruitment of anti-inflammatory macrophages was impaired in the colon of GB-exposed mice. These results are in concordance with those of Li et al. who found in similar experimental conditions (10–150 µm PE beads, 200 µg/g of food, and 5 week exposure) that TLR4, AP-1, and IRF-5 proteins were upregulated in colon, similarly reflecting a proinflammatory state (Li et al., 2020a). By contrast, Sun et al. showed that oral exposure to smaller PE microbeads (1–10 µm) at the dosage of 0.2 µg/g bw/d decreased *Il1β* expression, and increased *Il8* and *Il10* expression, rather in favor of an immunosuppressive effect of PE of this size (Sun et al., 2021). Therefore, the effects of ingested PE on colonic inflammation appear to be drastically different depending on the size of the microbeads. The difference in effect of RB exposure compared to GB might suggest that even a small difference in particle size at the time of ingestion could influence intestinal toxicity. Consistently, the PS MP uptake into human intestinal epithelial Caco-2 cell line was found greater for 4 µm particles than for 1 µm particles (Stock et al., 2019). Furthermore, Sun et al. observed that mouse exposure with PE MPs less than 10 µm in size induced a decreased abundance of Firmicutes and an increased abundance of Bacteroides, whereas these phyla did not vary in our study as well as in the one of Li et al. These findings suggest that the effects of PE MPs on microbiota are also size-dependent, as it has also been observed for PS MPs (Lu et al., 2018).

The metagenomic analysis of microbiota also revealed that PE microbeads of both sizes individually induced same variations of bacteria abundance at the order level. The Verrucomicrobiales were less abundant and the Gastranaerophilales were more abundant in exposed mice. The role of Verrucomicrobiales is not well known but their increase has been associated with the development of acute colitis in the Dextran Sodium sulfate (DSS)-induced model (Jin et al., 2021; Li et al.,

2020b). Gastranaerophilales are more abundant in DSS-induced colitis (Dou et al., 2020), and follow opposite trends in κ- and ι-carrageenan-induced colitis (Shang et al., 2017). These discrepancies are against an essential effect of these bacterial orders in colonic inflammation.

Another interesting finding is that the most substantial observed changes occurred following exposure to the mixture of the 2 sizes of PE beads. Firstly, we observed an increase of mucosal and mucin areas and an upregulation of *Muc2*, *Vill1*, and *Chga* transcripts in colon reflecting dysregulation of colon mucosa differentiation. An enhancement of *Ocln* and *F11r* expression was also observed suggesting potential barrier dysfunction. The mixture of PE beads induced an increase of *Il6* and *Ifng* expression in favor of a colon proinflammatory state. It also modulated the frequency of CD4⁺ T lymphocytes, CD8⁺ T lymphocytes, dendritic cells, and inflammatory monocytes in proximal small intestine, NK cells in distal small intestine, and anti-inflammatory macrophages in colon, showing pronounced alterations of intestinal immune response. Moreover, exposure to the mixture of PE beads decreased the abundance of protective Lactobacillales bacteria (Bartley et al., 2018). Lastly, PE mixture enhanced the frequency of Rhodospirillales, the increased abundance of which has been associated with several pathological conditions such as Damp Heat syndrome (Jiang et al., 2021), neuropsychiatric symptoms in Alzheimer’s disease (Zhou et al., 2021), and animal intoxication with N-nitrosamines (Zhu et al., 2019). Therefore, the imbalance observed in the abundance of Rhodospirillales and Lactobacillales could contribute to the negative effects observed following exposure to the 2 types of microbeads, and this deserves to be further explored. Taken together, these results show that, as a mixture, the 2 sizes of PE microbeads more severely affected the homeostasis of intestinal tissues than as single exposure. Liang et al. revealed that in mice, co-exposure to a mixture of PS particles of 50 and 500 nm caused more severe dysfunction of the intestinal barrier than that caused by each PS particles individually (Liang et al., 2021). The authors also demonstrated that co-exposure to several sizes of PS particles modulated their biodistribution in mouse organs and increased their bioavailability. The hypothesis can be put forward that, as for PS, the aggravation of the effects that we observed in the group exposed to RB + GB could be partly explained by an increased bioaccumulation of PE microbeads in the event of co-exposure. Interestingly, in the latter study, exposure 50 nm PS particles increased mucus secretion in the duodenum, jejunum and ileum, whereas it was decreased in the colon. The decline of mucus secretion in colon was confirmed following 0.5, 5 and 50 µm PS MP exposure in mice (Jin et al., 2019; Lu et al., 2018). In our work, mucus

secretion was respectively decreased in proximal small intestine and increased in colon after co-exposure to 36 and 116 µm PE MPs, whereas smaller sizes PE MPs reduced colon mucin density (Sun et al., 2021). The comparison of the effects observed on this parameter common to several publications shows that the impact of MPs depends on the type of polymer, its size, and the location in the intestine, which underlines the need to continue testing different experimental conditions in order to allow strong advances in the understanding of the MP toxicological effects.

Taken together, previous and present studies suggest that PE exposure poses a substantial risk to human intestinal health. Moreover, evidence of a positive correlation between the concentration of fecal MPs and the severity of disease activity (Harvey-Bradshaw index and Mayo score) has been recently reported in a cohort of patients with inflammatory bowel disease (IBD) (Yan et al., 2022). Polyethylene was found in the feces of these patients. Therefore, presence of PE in stool may contribute to the development of inflammation in IBD.

5. Conclusions

The present study demonstrated that a 6-week oral exposure of mice to PE microbeads induced histological, inflammatory, and immune disturbances from the proximal small intestine to the colon. The relative abundance of bacterial orders was also modified. The co-exposure of 2 sizes of PE microbeads led to defects related to gut differentiation, barrier function, and immune response. These alterations of gut response could contribute in the long term to the onset of immune-mediated inflammatory diseases. Human population studies should be performed to correlate PE exposure levels and disease risks.

Author statement

Madjid DJOUINA: Investigation, **Cécile VIGNAL:** Conceptualization, Writing-review, Funding acquisition, **Alexandre DEHAUT:** Investigation, Methodology, Supervision, Writing – original draft, **Ségolène CABOCHE:** Formal analysis, Nell HIRT; Investigation, **Christophe WAXIN:** Investigation, **Charlotte HIMBER:** Investigation, **Delphine BEURY:** Investigation, **David HOT:** Supervision, **Laurent DUBUQUOY:** Funding acquisition, **David LAUNAY:** Funding acquisition, **Guillaume DUFLOS:** Funding acquisition, Supervision, **Mathilde BODY-MALAPPEL:** Writing – original draft, Conceptualization, Validation, Formal analysis, Visualization, Supervision, Revision

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 UMS2014-US41. We would like to thank Nathalie Jouy from the Flow Cytometry Core Facility, Biolmaging Center of Lille, for technical advice in flow cytometry. We also thank Thomas Hubert and the staff of the animal facility of Lille, for animal care. We thank Bernadette Leu for her broad-spectrum help. Editorial assistance, in the form of language editing and correction, was provided by XpertScientific Editing and Consulting Services.

References

- Bachmanov, A.A., Reed, D.R., Beauchamp, G.K., Tordoff, M.G., 2002. Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains. *Behav. Genet.* 32, 435–443. <https://doi.org/10.1023/A:1020884312053>.
- Bardaji, D.K.R., Moretto, J.A.S., Furlan, J.P.R., Stehling, E.G., 2020. A mini-review: current advances in polyethylene biodegradation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36, 32. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-2808-5>.

- Bartley, A., Yang, T., Arocha, R., Malphurs, W.L., Larkin, R., Magee, K.L., Vickroy, T.W., Zubcevic, J., 2018. Increased abundance of Lactobacillales in the colon of beta-adrenergic receptor knock out mouse is associated with increased gut bacterial production of short chain fatty acids and reduced IL17 expression in circulating CD4 + immune cells. *Front. Physiol.* 9, 1593. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01593>.
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvallet, C., Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., Gibson, D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G.A., Janssen, S., Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kaehler, B.D., Kang, K.B., Keefe, C.R., Keim, P., Kelley, S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciulek, T., Kreps, J., Langille, M.G.L., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.-X., Lofffield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B.D., McDonald, D., McIver, L.J., Melnik, A.V., Metcalf, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T., Naimey, A.T., Navas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian, S.B., Pearson, T., Peoples, S.L., Petras, D., Preuss, M.L., Pruesse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A., Robeson, M.S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P.J., Ul-Hasan, S., van der Hooft, J.J.J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R., Caporaso, J.G., 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
- Braun, T., Ehrlich, L., Henrich, W., Koeppel, S., Lomako, I., Schwabl, P., Liebmann, B., 2021. Detection of microplastic in human placenta and meconium in a clinical setting. *Pharmaceutics* 13, 921. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13070921>.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- Daniel, D.B., Ashraf, P.M., Thomas, S.N., Thomson, K.T., 2021. Microplastics in the edible tissues of shellfishes sold for human consumption. *Chemosphere* 264, 128554. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128554>.
- Danopoulos, E., Twiddy, M., Rotchell, J.M., 2020. Microplastic contamination of drinking water: a systematic review. *PLoS One* 15 (7), e0236838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236838>.
- Davis, N.M., Proctor, D.M., Holmes, S.P., Relman, D.A., Callahan, B.J., 2018. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome* 6, 226. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0605-2>.
- Dehaut, A., Cassone, A.-L., Frère, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., Rivière, G., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Duflos, G., Paul-Pont, I., 2016. Microplastics in seafood: benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environ. Pollut.* 215, 223–233. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.018>.
- Deng, Y., Zhang, Y., Lemos, B., Ren, H., 2017. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Sci. Rep.* 7, 46687. <https://doi.org/10.1038/srep46687>.
- Dou, X., Gao, N., Yan, D., Shan, A., 2020. Sodium butyrate alleviates mouse colitis by regulating gut microbiota dysbiosis. *Animals* 10, 1154. <https://doi.org/10.3390/ani10071154>.
- Dourson, M., Ewart, L., Fitzpatrick, S.C., Barros, S.B.M., Mahadevan, B., Hayes, A.W., 2021. The future of uncertainty factors with in vitro studies using human cells. *Toxicol. Sci.* 186 (1), 12–17. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfab134>.
- Geyer, R., Jambeck, J.R., Law, K.L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.* 3 (7), 1–5. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>.
- Hirt, N., Body-Malapel, M., 2020. Immunotoxicity and intestinal effects of nano- and microplastics: a review of the literature. *Part. Fibre Toxicol.* 17, 1–22. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00387-7>.
- Hunt, C.F., Lin, W.H., Voulvoulis, N., 2021. Evaluating alternatives to plastic microbeads in cosmetics. *Nat. Sustain.* 4, 366–372. <https://doi.org/10.1038/s41893-020-00651-w>.
- Jambeck, J.R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., Law, K.L., 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* 347, 768–771. <https://doi.org/10.1126/science.1260352>.
- Jin, M.-Y., Wu, X.-Y., Li, M.-Y., Li, X.-T., Huang, R.-M., Sun, Y.-M., Xu, Z.-L., 2021. Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit polysaccharides regulated IBD mice via targeting gut microbiota: association of JNK/ERK/NF-κB signaling pathways. *J. Agric. Food Chem.* 69, 10151–10162.
- Jiang, K., Jiang, Q., Mo, X., Li, J., Hu, H., Huang, Q., Guo, W., Qiu, T., Ren, J., Zhang, L., 2021. Study on the Characteristics of Gut Microbiota in Chronic Hepatitis B Patients with Damp Heat Syndrome and Liver Depression and Spleen Deficiency Syndrome. *World Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*.
- Jin, Y., Lu, L., Tu, W., Luo, T., Fu, Z., 2019. Impacts of polystyrene microplastic on the gut barrier, microbiota and metabolism of mice. *Sci. Total Environ.* 649, 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.353>.
- Katsara, K., Kenanakis, G., Viskadourakis, Z., Papadakis, V.M., 2021. Polyethylene migration from food packaging on cheese detected by Raman and infrared (ATR/FT-IR) spectroscopy. *Materials* 14, 3872. <https://doi.org/10.3390/ma14143872>.
- Kedzierski, M., Lechat, B., Sire, O., Le Mager, G., Le Tilly, V., Bruzaud, S., 2020. Microplastic contamination of packaged meat: occurrence and associated risks. *Food Packag. Shelf Life* 24, 100489. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100489>.

- Li, B., Ding, Y., Cheng, X., Sheng, D., Xu, Z., Rong, Q., Wu, Y., Zhao, H., Ji, X., Zhang, Y., 2020a. Polyethylene microplastics affect the distribution of gut microbiota and inflammation development in mice. *Chemosphere* 244, 125492. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125492>.
- Li, R., Wang, G.P., Whitlock, J.A., Zhao, S., Yazig, Y., Gu, L., 2020b. Muscadine grapes (*Vitis rotundifolia*) and dealcoholized muscadine wine alleviated symptoms of colitis and protected against dysbiosis in mice exposed to dextran sulfate sodium. *J. Funct. Foods* 65, 103746. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103746>.
- Li, S., Ma, Y., Ye, S., Tang, S., Liang, N., Liang, Y., Xiao, F., 2021. Polystyrene microplastics trigger hepatocyte apoptosis and abnormal glycolytic flux via ROS-driven calcium overload. *J. Hazard Mater.* 417, 126025. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126025>.
- Liang, B., Zhong, Y., Huang, Y., Lin, X., Liu, J., Lin, L., Hu, M., Jiang, J., Dai, M., Wang, B., Zhang, B., Meng, H., Lelaka, J.J.J., Sui, H., Yang, X., Huang, Z., 2021. Underestimated health risks: polystyrene micro- and nanoplastics jointly induce intestinal barrier dysfunction by ROS-mediated epithelial cell apoptosis. *Part. Fibre Toxicol.* 18, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12989-021-00414-1>.
- Lu, L., Wan, Z., Luo, T., Fu, Z., Jin, Y., 2018. Polystyrene microplastics induce gut microbiota dysbiosis and hepatic lipid metabolism disorder in mice. *Sci. Total Environ.* 631–632, 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.051>.
- Luo, T., Wang, C., Pan, Z., Jin, C., Fu, Z., Jin, Y., 2019. Maternal polystyrene microplastic exposure during gestation and lactation altered metabolic homeostasis in the dams and their F1 and F2 offspring. *Environ. Sci. Technol.* 53, 10978–10992. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03191>.
- Martin, B.D., Witten, D., Willis, A.D., 2020. Modeling microbial abundances and dysbiosis with beta-binomial regression. *Ann. Appl. Stat.* 14, 94–115. <https://doi.org/10.1214/19-aos1283>.
- Montazer, Z., Habibi Najafi, M.B., Levin, D.B., 2020. Challenges with verifying microbial degradation of polyethylene. *Polymers* 12, 123. <https://doi.org/10.3390/polym12010123>.
- Munari, C., Scoptoni, M., Sfriso, A.A., Sfriso, A., Aiello, J., Casoni, E., Mistri, M., 2021. Temporal variation of floatable plastic particles in the largest Italian river, the Po. *Mar. Pollut. Bull.* 171, 112805. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112805>.
- Murray, E., Cheng, X., Krishna, A., Jin, X., Ohara, T.E., Stappenbeck, T.S., Bose, R., 2021. HER2 and APC mutations promote altered crypt-villus morphology and marked hyperplasia in the intestinal epithelium. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 12 (3), 1105–1120. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.04.012>.
- Oliveri Conti, G., Ferrante, M., Banni, M., Favara, C., Nicolosi, I., Cristaldi, A., Fiore, M., Zuccarello, P., 2020. Micro- and nano-plastics in edible fruit and vegetables. The first diet risks assessment for the general population. *Environ. Res.* 187, 109677. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109677>.
- Plastics Europe, 2021. *Plastics - the facts 2020* • plastics Europe. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2020/>.
- Rillig, M.C., Kim, S.W., Kim, T.-Y., Waldman, W.R., 2021. The global plastic toxicity debt. *Environ. Sci. Technol.* 55, 2717–2719. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07781>.
- Schwabl, P., Köppel, S., Königshofer, P., Bucsics, T., Trauner, M., Reiberger, T., Liebmann, B., 2019. Detection of various microplastics in human stool: a prospective case series. *Ann. Intern. Med.* 171 (7), 453–457. <https://doi.org/10.7326/M19-0618>.
- Senathirajah, K., Attwood, S., Bhagwat, G., Carbery, M., Wilson, S., Palanisami, T., 2021. Estimation of the mass of microplastics ingested – a pivotal first step towards human health risk assessment. *J. Hazard Mater.* 404, 124004. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124004>.
- Shang, Q., Sun, W., Shan, X., Jiang, H., Cai, C., Hao, J., Li, G., Yu, G., 2017. Carrageenan-induced colitis is associated with decreased population of anti-inflammatory bacterium, *Akkermansia muciniphila*, in the gut microbiota of C57BL/6J mice. *Toxicol. Lett.* 279, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.904>.
- Shengchen, W., Jing, L., Yujie, Y., Yue, W., Shiwen, X., 2021. Polystyrene microplastics-induced ROS overproduction disrupts the skeletal muscle regeneration by converting myoblasts into adipocytes. *J. Hazard Mater.* 417, 125962. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125962>.
- Stock, V., Böhmert, L., Lisicki, E., Block, R., Cara-Carmona, J., Pack, L.K., Selb, R., Lichtenstein, D., Voss, L., Henderson, C.J., Zabinsky, E., Sieg, H., Braeuning, A., Lampen, A., 2019. Uptake and effects of orally ingested polystyrene microplastic particles in vitro and in vivo. *Arch. Toxicol.* 93, 1817–1833. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02478-7>.
- Sun, H., Chen, N., Yang, X., Xia, Y., Wu, D., 2021. Effects induced by polyethylene microplastics oral exposure on colon mucin release, inflammation, gut microflora composition and metabolism in mice. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 220, 112340. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112340>.
- Trelles, R., Cayla, A., Gaspéri, J., Strich, B., Ausset, P., Tassin, B., 2020. Impacts of organic matter digestion protocols on synthetic, artificial and natural raw fibers. *Sci. Total Environ.* 748, 141230. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141230>.
- Wang, J., Liu, X., Li, Y., Powell, T., Wang, X., Wang, G., Zhang, P., 2019. Microplastics as contaminants in the soil environment: a mini-review. *Sci. Total Environ.* 691, 848–857. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.209>.
- Wei, Z., Wang, Y., Wang, S., Xie, J., Han, Q., Chen, M., 2022. Comparing the effects of polystyrene microplastics exposure on reproduction and fertility in male and female mice. *Toxicology* 465, 153059. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.153059>.
- Wright, S.L., Kelly, F.J., 2017. Plastic and human health: a micro issue? *Environ. Sci. Technol.* 51, 6634–6647. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00423>.
- Xie, X., Deng, T., Duan, J., Xie, J., Yuan, J., Chen, M., 2020. Exposure to polystyrene microplastics causes reproductive toxicity through oxidative stress and activation of the p38 MAPK signaling pathway. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 190, 110133. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110133>.
- Yan, Z., Liu, Y., Zhang, T., Zhang, F., Ren, H., Zhang, Y., 2022. Analysis of microplastics in human feces reveals a correlation between fecal microplastics and inflammatory bowel disease status. *Environ. Sci. Technol.* 56, 414–421. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c03924>.
- Zhang, N., Li, Y.B., He, H.R., Zhang, J.F., Ma, G.S., 2021. You are what you eat: microplastics in the feces of young men living in Beijing. *Sci. Total Environ.* 767, 144345. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144345>.
- Zhou, Y., Wang, Y., Quan, M., Zhao, H., Jia, J., 2021. Gut microbiota changes and their correlation with cognitive and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 81, 583–595. <https://doi.org/10.3233/JAD-201497>.
- Zhu, J., Kong, Y., Yu, J., Shao, S., Mao, M., Zhao, M., Yue, S., 2019. Consumption of drinking water N-Nitrosamines mixture alters gut microbiome and increases the obesity risk in young male rats. *Environ. Pollut.* 248, 388–396. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.012>.

1.3. Conclusion de l'article 2

Les résultats de cette étude mettent en évidence que l'exposition orale des souris aux microbilles de PE pendant 6 semaines entraîne des altérations histologiques, inflammatoires et immunitaires de l'intestin, de la partie proximale de l'intestin grêle jusqu'au côlon. De plus, l'abondance relative des ordres bactériens est également modifiée. Lorsque les souris sont exposées simultanément à deux tailles de microbilles de PE, des défauts sont observés dans la différenciation intestinale, la fonction barrière et la réponse immunitaire. Ces altérations de la réponse intestinale pourraient potentiellement contribuer à long terme à l'apparition de maladies inflammatoires à médiation immunitaire. Des études épidémiologiques portant sur la population humaine devraient être réalisées afin d'établir des corrélations entre les niveaux d'exposition au PE et les risques de maladies.

2. Partie 2 : L'exposition orale aux microplastiques de polyéthylène induit des changements inflammatoires et métaboliques et favorise la fibrose dans le foie des souris.

2.1. Résumé de l'article 3

Des preuves accumulées montrent une contamination généralisée des sources d'eau et des aliments par les microplastiques. Bien que le foie soit l'un des principaux sites de bioaccumulation dans le corps humain, on ignore encore si les microplastiques ont des effets néfastes. En particulier, les conséquences hépatiques de l'ingestion de microbilles de polyéthylène chez les mammifères restent inconnues.

Dans cette étude, des souris femelles ont été nourries avec une alimentation contaminée par des microbilles de PE de diamètres de 36 et 116 µm, soit individuellement, soit en combinaison, à une dose de 16 mg/kg de poids corporel/jour pendant 6 et 9 semaines.

Le foie des souris a montré des altérations au niveau des gènes impliqués dans l'absorption, la synthèse et la bêta oxydation des acides gras. L'ingestion de microbilles de PE a perturbé la réponse de détoxification, favorisé un déséquilibre oxydant, augmenté la formation de foyers inflammatoires et l'expression de cytokines, et stimulé la prolifération hépatique.

Étant donné que l'expression relative du marqueur des cellules étoilées hépatiques, Pdgfa (Platelet Derived Growth Factor Subunit A), a augmenté après l'exposition au PE, nous avons évalué l'effet de l'ingestion de PE dans un modèle murin de fibrose induite par le CCl₄ (tétrachlorure de carbone) et avons montré que l'exposition alimentaire au PE exacerbe la fibrogénèse hépatique.

Ces résultats constituent la première démonstration des effets hépatiques néfastes de l'ingestion de PE chez les mammifères et mettent en évidence la nécessité d'une évaluation plus approfondie des risques pour la santé chez l'Homme.

2.2. Article 3

Ecotoxicology and Environmental Safety 264 (2023) 115417



Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv

Oral exposure to polyethylene microplastics induces inflammatory and metabolic changes and promotes fibrosis in mouse liver.

Madjid Djouina, Christophe Waxin, Laurent Dubuquoy, David Launay, Cécile Vignal, Mathilde Body-Malapel

Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286- INFINITE - Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Microplastics
Polyethylene
Mice
Liver
Fibrosis
Lipid metabolism

ABSTRACT

Accumulating evidence shows widespread contamination of water sources and food with microplastics. Although the liver is one of the main sites of bioaccumulation within the human body, it is still unclear whether microplastics produce damaging effects. In particular, the hepatic consequences of ingesting polyethylene (PE) microplastics in mammals are unknown. In this study, female mice were fed with food contaminated with 36 and 116 μm diameter PE microbeads at a dosage of 100 $\mu\text{g/g}$ of food for 6 and 9 weeks. Mice were exposed to each type of microbead, or co-exposed to the 2 types of microbeads. Mouse liver showed altered levels of genes involved in uptake, synthesis, and β -oxidation of fatty acids. Ingestion of PE microbeads disturbed the detoxification response, promoted oxidative imbalance, increased inflammatory foci and cytokine expression, and enhanced proliferation in liver. Since relative expression of the hepatic stellate cell marker *Pdgfra* and collagen deposition were increased following PE exposure, we assessed the effect of PE ingestion in a mouse model of CCl_4 -induced fibrosis and showed that PE dietary exposure exacerbated liver fibrogenesis. These findings provide the first demonstration of the adverse hepatic effects of PE ingestion in mammals and highlight the need for further health risk assessment in humans.

1. Introduction

In the wake of industrial development and anthropogenic activities, a dramatic expansion in global production chains for plastic goods has occurred over the past several decades (Lim, 2021). Currently, about 400 million tons of plastic materials are produced each year, and this is projected to double by 2050 (Lim, 2021). Due to accelerated production and limited reuse, transformation, and recycling initiatives, the world's ability to handle the excess of used plastic products has been overwhelmed (Ferronato and Torretta, 2019). Once discarded in nature, plastic waste is exposed to physical (e.g., ultraviolet radiation and temperature), chemical (e.g., salinity, pH, and corrosive agents), and biological (e.g., bacteria, microalgae, and plankton) factors that cleave these materials into microplastic (MP; 1–5000 μm in diameter) and nanoplastic (NP; $<1 \mu\text{m}$) particles (Hirt and Body-Malapel, 2020; Song et al., 2017).

Humans are exposed to MPs every day. They are omnipresent in our food, beverages, water, and air (Gasperi et al., 2018; Mortensen et al.,

2021). A recent study estimated MP median intake rates are 553 and 883 particles/capita/day for children and adults, respectively. This intake can lead to irreversible accumulation in tissues of 8.32×10^3 particles/capita for children and up to 5.01×10^4 particles/capita for adults (Mohamed Nor et al., 2021). Human exposure to MPs starts *in utero* and lasts a lifetime. For example, a pilot study detected MPs in meconium sampled during two cesarean sections for breech deliveries (Braun et al., 2021). Another study that analyzed MPs in three meconium as well as 6 infant and 10 adult fecal samples concluded that MP concentrations were significantly higher in infant than in adult stool (J. Zhang et al., 2021a). Several studies have detected various MPs in human adult stool (Luqman et al., 2021; Schwabl et al., 2019; Wibowo et al., 2021). MPs were also found in human colectomy and cirrhotic samples (Horvatits et al., 2022; Ibrahim et al., 2021). Furthermore, accumulating evidence from human and mouse studies have shown that MPs disrupt the integrity of the intestinal barrier, enter the bloodstream (Leslie et al., 2022; Sun et al., 2022), and accumulate in different tissues and organs such as gut, liver, brain, and kidney (Deng et al., 2017; Im et al., 2022;

* Correspondence to: Institute for Translational Research in Inflammation, INFINITE - Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286, Faculté de Médecine - Pôle Recherche, 4ème étage Centre, Place Verdun, F-59045 Lille, France.

E-mail address: mathilde.body@univ-lille.fr (M. Body-Malapel).

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115417>

Received 20 June 2023; Received in revised form 23 August 2023; Accepted 26 August 2023

Available online 29 August 2023

0147-6513/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Mu et al., 2022).

As the main bioaccumulation target of MPs, the liver has been the subject of several studies on the impact of MP ingestion in mice. Hepatotoxicity and lipid metabolism disturbances have been observed after ingestion of polystyrene (PS) MPs (Cheng et al., 2022a; Lu et al., 2018). Oral exposure to PS MPs induced oxidative stress (Deng et al., 2017; Mu et al., 2022) and promoted inflammation under basal and pathological conditions (Deng et al., 2017; Huang et al., 2022; Luo et al., 2022; Wen et al., 2022; Zhao et al., 2021; Zheng et al., 2021). Several hallmarks of hepatotoxicity were also observed following chronic exposure to polyvinyl chloride (PVC) MPs (Chen et al., 2022).

Although PE is the most abundant polymer in raw and treated drinking water and bottled mineral water (Mortensen et al., 2021), and one of the most common monomers found in human food (Bai et al., 2022), little is known regarding its effect on mammalian liver. Thus far it has been reported that PE MP exposure induces liver damage in several aquatic organisms (da Costa Araújo et al., 2020; Dong et al., 2022; Hu et al., 2022; Lu et al., 2022; Mak et al., 2019). Therefore, the purpose of this study was to explore the hepatic effects of sub-chronic PE MP exposure in mice.

2. Methods and materials

2.1. Particles

PE microbeads were acquired from Cospheric (Santa Barbara, USA). Two categories of microbeads were used: red fluorescent beads (RB; item# UVPMS-BR-1.090; 10–45 µm) and green fluorescent beads (GB; item# UVPMS-BG-1.00; 106–125 µm). Size range and polymeric composition were characterized in a previous study (Djouina et al., 2022a). The median size of microbeads was 36 and 116 µm for RB and GB, respectively. Both were composed of a pure PE polymer as confirmed by Fourier transform infrared spectra.

2.2. Mice and experimental protocols

All animal procedures were conducted in accordance with institutional guidelines approved by the Animal Care and Ethical Use Committee of the University of Lille (committee no.75; authorization no. APAFIS #38663–2022082613292602). C57BL/6 mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) and housed under standard conditions. Female mice from 7 to 12 weeks old were used in the study.

In the first set of experiments, mice were randomly assigned to 4 experimental groups (n = 10/group): 1) control group, receiving control food; 2) RB group, receiving food spiked with 100 µg RB microbeads/g of food; 3) GB group, receiving food spiked with 100 µg of GB microbeads/g of food; and 4) RB+GB group, receiving food spiked with 100 µg each of RB and GB microbeads/g of food. The concentration of PE microbeads added to food was 100 µg/g since this amount is within the realistic range of human ingestion levels (Djouina et al., 2022a; Senthirajah et al., 2021). Treatment periods were either 6 or 9 weeks. Blood and liver were sampled at necropsy.

In the second set of experiments, to induce chronic liver fibrosis, 8-week old C57BL/6 female mice were injected with CCl₄ (Sigma-Aldrich; 0.2 ml/kg; in olive oil at a ratio of 1:4; *i.p.* injection twice a week for 8 weeks). Mice were randomly divided into 5 groups (n = 8/group): 1) control group, receiving control food and olive oil *i.p.* repeated injections; 2) CCl₄ group, receiving control food and CCl₄ repeated injections; 3) CCl₄ +RB group, receiving food spiked with 100 µg of RB microbeads/g of food and CCl₄ repeated injections; 4) CCl₄ +GB group, receiving food spiked with 100 µg of GB microbeads/g of food and CCl₄ repeated injections; and 5) CCl₄ +RB+GB group, receiving food spiked with 100 µg each of RB and GB microbeads/g of food and CCl₄ repeated injections. Animals were sacrificed 24 h after the last injection of CCl₄. Blood and liver were sampled at necropsy.

2.3. Serum enzyme activity

Serum activity of alanine transaminase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured using commercial kits (MAK052 and MAK055, Sigma-Aldrich). The optical density (OD) at 570 nm for ALT and 450 nm for AST was measured using a microplate reader (FluostarOmega, BMG Labtech). Following incubation for 2–3 min at 37 °C, initial absorbance was recorded and kinetic measurements were recorded every 5 min for 1 h. Pyruvate and glutamate were used as standards for ALT and AST, respectively. ΔOD was calculated and ALT and AST activities were derived based on the ratio of ΔOD and reaction time.

2.4. Liver total cholesterol, triglyceride, and free fatty acid content measurements

To isolate lipids, liver samples (~50 mg) were homogenized in 1 ml of 2:1 (v/v) chloroform-methanol mixture. Following centrifugation at 1000 g, 1 ml of supernatant was recovered and 200 µl of distilled water was added. Samples were centrifuged at 650 g and the organic layer was removed, evaporated for 24 h, and reconstituted in isopropanol. Triglyceride content was measured with Triglyceride Reagent (T2449, Sigma-Aldrich) and Free Glycerol Reagent (T2449, Sigma-Aldrich). Glycerol Standard (G7793, Sigma-Aldrich) was used as a reference standard. OD was measured at 450 nm. Total cholesterol and free fatty acids were assayed using commercially available kits (Cholesterol FS # 1300 99 10 021, DiaSys, and free fatty acid quantification kit, MAK044, Sigma-Aldrich, respectively).

2.5. Liver histological analysis

Liver was fixed in 4% formaldehyde overnight, processed, and embedded in paraffin wax by an automatic sample preparation system (LOGOS One, Milestone). Serial histological sections of 4 µm thickness were cut, deparaffinized, rehydrated for hematoxylin and eosin (H&E) staining (05–06004/L, 05–10007/L, Bio-Optica) or sirius red staining (P6744 and 365548, Sigma-Aldrich). The slides were scanned on a Zeiss AxioScan.Z1® slide scanner (Zeiss, Jena, Germany) at 20X magnification.

Whole tissue was analyzed with QuPath software (version 0.4.1.) (Bankhead et al., 2017). To localize and quantify inflammatory foci, the "Cell Detection" command was used followed by the "Cell Classification" command for identification of immune cells. Each inflammatory focus was manually drawn, measured, and counted. To quantify sirius red staining, the "Estimate Stain Vectors" command was applied to each slide and then the percentage of staining was calculated with the "Positive Cell Detection" command.

2.6. Immunohistochemical staining and quantification

Serial histological sections of 4 µm thickness were cut, deparaffinized, and rehydrated. For antigen unmasking, sections were placed in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) and incubated in a heat-induced antigen retrieval chamber for 20 min at 121 °C. After washing, sections were blocked for 30 min with 5% goat serum. Rabbit anti-mouse Ki-67 primary antibody (MA5–14520, Invitrogen) and rabbit anti-mouse alpha-smooth muscle actin (α-SMA) primary antibody (#19245, Signaling Technology) were then incubated overnight at 4 °C (1:200 dilution). After washing, tissue sections were incubated for 30 min at room temperature with ImmPRESS® HRP Goat Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit (Vector Laboratories, Inc., United States) and staining was exposed with SignalStain® DAB Substrate (#8059, Cell Signaling Technology). Nuclear staining with hematoxylin was performed before addition of mounting medium. The slides were then scanned under 20X magnification as described earlier. Immunostaining quantification was performed with QuPath software. The percentage of cells positive for either Ki-67 or α-SMA staining was calculated with the

"Positive Cell Detection" command.

For apoptosis analysis in liver sections, the In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red TUNEL technology (#12156792910, Roche) was performed according to manufacturer's specifications. Tissue sections were dewaxed, rehydrated as described earlier, and pretreated in permeabilization solution (0.1% Triton X-100 *, 0.1% sodium citrate) for 8 min. After washing, the samples were labeled with the TUNEL reaction mixture and incubated for 60 min at + 37 °C in a humidified atmosphere in the dark. Sections were counterstained with DAPI (Molecular Probes, Eugene OR, USA). The slides were then scanned at 20X magnification and the percentage of positive cells was quantified with the "Positive Cell Detection" command in Qupath software.

2.7. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Liver tissue samples were homogenized with ceramic beads using a FastPrep-24 tissue homogenizer (MP Biomedical). Total RNA was extracted with the NucleoSpin® RNA kit (Macherey-Nagel). Transcript levels of genes were quantified with the StepOne™ Real-Time PCR system using a SYBR Green PCR master mix (Thermo Fisher Scientific). The primer sequences were designed using Primer Express 3 (Thermo Fisher Scientific) and are available upon request. Melting curve analyses were performed for each sample and gene to confirm the specificity of the amplification. The relative expression of each target gene was normalized to the relative expression of the *Polr2a* gene. Quantification of target gene expression was based on the comparative cycle threshold (Ct) value. The fold changes in the target genes were analyzed by the 2^{-ΔΔCt} method.

2.8. Liver malondialdehyde (MDA) analysis

Liver lysates were incubated with acetic acid and sodium dodecyl

sulfate at 95 °C for 1 h, followed by centrifugation at 800 g for 10 min. Supernatants were transferred to a black 96-well plate and the fluorescence intensity was measured at λ_{ex} = 532 and λ_{em} = 553 nm. 1,1,3,3-Tetramethoxypropane (Sigma-Aldrich) was used as a standard. Protein concentration in samples was determined using the DC™ protein assay (Bio-Rad Laboratories). Liver MDA concentration was normalized by the sample protein concentration and expressed as nanomoles per mg of protein.

2.9. Statistics

Results are expressed as mean ± standard error of the mean. The statistical significance of differences between experimental groups was calculated using the Mann-Whitney nonparametric U test (GraphPad Prism software, USA). Statistical significance was defined as p < 0.05.

3. Results

Exposure to 36 μm RB and 116 μm GB PE microbeads individually or in combination for 6 and 9 weeks did not induce mouse mortality, gross clinical symptoms, or significant body weight variation compared to the control group (Suppl. Fig. 1A). After 9 weeks of exposure, the mice exposed to RB-contaminated diet showed increased serum AST and ALT activities, suggesting potential hepatotoxicity of PE microbeads (Suppl. Fig. 1B).

3.1. PE microbeads cause disturbances in liver lipid metabolism

Hepatic transcriptional levels of genes related to fatty acid metabolism were evaluated using RT-qPCR to determine the effect of PE microbead exposure (Luo et al., 2019; X. Wang et al., 2023b). After a 6-week administration period, the relative expression of two genes

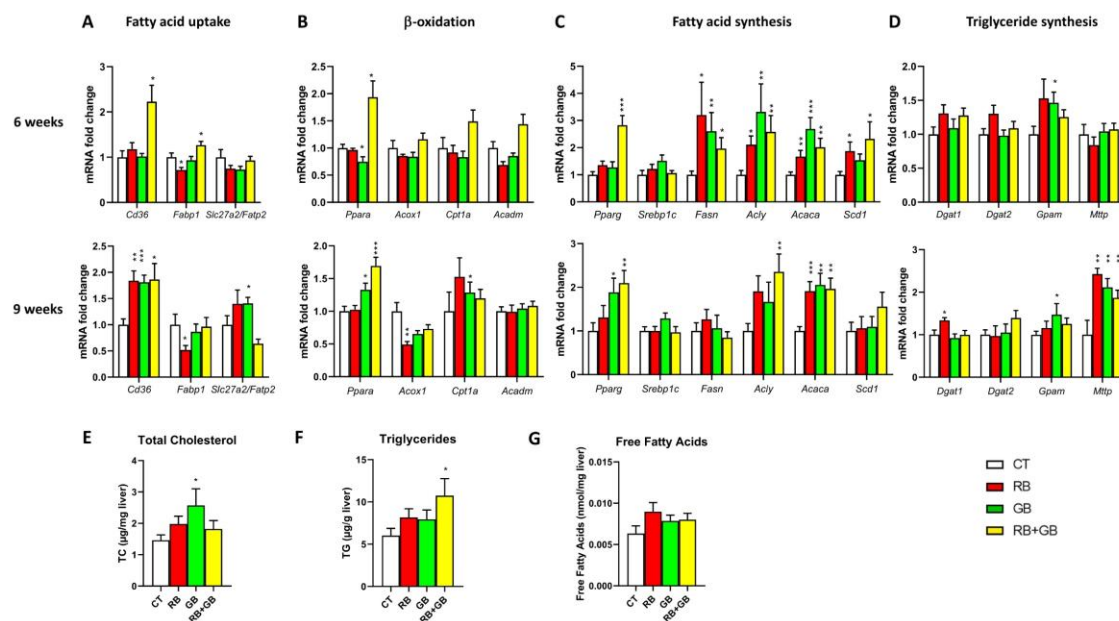


Fig. 1. Effects of polyethylene (PE) exposure on liver lipid metabolism. Mice were exposed to food spiked with 100 μg/g of PE microbeads (red beads (RB), green beads (GB), or RB+GB; n = 10/group) or control food (CT; n = 10) for 6 and 9 weeks. Gene expression was quantified by RT-qPCR for (A) fatty acid uptake markers, (B) β-oxidation markers, (C) fatty acid synthesis markers, and (D) triglyceride synthesis markers. In addition, biochemical analysis of liver (E) cholesterol, (F) triglyceride and (G) free fatty acid levels were assessed. Upper panel: 6 weeks exposure. Medium and lower panel: 9 weeks exposure. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005, and **** p < 0.001 compared to the control group as determined by the Mann-Whitney U test.

involved in fatty acid uptake, platelet glycoprotein 4 (*Cd36*) and fatty acid binding-protein, liver (*Fabp1*), were increased in mice exposed to RB+GB contaminated food as compared to control mice (Fig. 1A). Exposure to RB-contaminated food induced downregulation of *Fabp1* in liver. The third marker of fatty uptake, long-chain fatty acid transport protein 2 *Slc27a2/Fatp2*, was not modified by PE dietary exposure. A two-fold increase in expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (*Ppara*) gene was detected after exposure to both types of PE microbeads, whereas the transcription of the others genes involved in β -oxidation, including peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 (*Acox1*), carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform (*Cpt1a*), and medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (*Acadm*), did not vary between groups (Fig. 1B). For genes involved in fatty acid synthesis, levels of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*Pparg*) and acyl-CoA desaturase 1 (*Scd1*) were elevated in the liver of RB+GB exposed mice, and fatty acid synthase (*Fasn*), ATP-citrate lyase (*Acly*), and acetyl-CoA carboxylase 1 (*Acaca*) were significantly upregulated in all groups of PE-exposed mice (Fig. 1C). Genes involved in triglyceride synthesis, diacylglycerol O-acyltransferase 1 (*Dgat1*), diacylglycerol O-acyltransferase 2 (*Dgat2*), glycerol-3-phosphate acyltransferase 1, mitochondrial (*Gpam*), and microsomal triglyceride transfer protein large subunit (*Mtp*), were not modified by PE exposure, with the exception of *Gpam* which was increased in GB-exposed mice (Fig. 1D). After 9-week exposure, significant modulation of fatty acid metabolism markers was also observed. Exposure to RB microbeads downregulated the expression of *Fabp1* and *Acox1* and upregulated the expression of *Dgat1*. Exposure to GB microbeads increased the levels of *Fatp2*, *Cpt1a*, and *Gpam*. Expression of *Ppara* and *Pparg* was higher in liver of mice exposed to GB and RB+GB. The relative expression of *Cd36*, *Acaca*, and *Mtp* was increased in all groups of PE-exposed mice. In summary, dietary exposure to PE microbeads disturbed genes associated with fatty acid metabolism in favor of increased mRNA levels of genes associated with fatty acid uptake, β -oxidation, and synthesis.

Biochemical parameters of the liver were also evaluated. Liver cholesterol levels were significantly increased in mice fed with food contaminated with GB microbeads (Fig. 1E). Hepatic triglycerides were elevated in mice exposed to RB+GB-contaminated food (Fig. 1F). The hepatic levels of free fatty acids were not significantly modified (Fig. 1G). Taken together, these data show that dietary exposure to PE microbeads altered lipid metabolism in liver of exposed mice.

3.2. PE microbeads alter liver detoxification and oxidative defense biomarkers

Hepatic metabolism is generally conducted in two phases and carried out by distinct groups of enzymes. For phase 1, hepatic cytochrome p450 (Cyp) is the main enzyme group. Among this gene family, *Cyp2a4* and *Cyp2b10* mRNA levels were increased in the three groups of PE-exposed mice after 6-week exposure (Fig. 2A). The upregulation of *Cyp2a4* in liver was also observed after 9-week exposure. The main phase 2 xenobiotic metabolizing enzymes are glutathione S-transferases and UDP glucuronosyl-transferases. Levels of *Gsta1* were upregulated in livers of mice exposed to RB, GB, and RB+GB after 6 weeks, and *Ugt1a1* in liver of RB+GB-exposed mice after 9-week exposure.

The effect of PE dietary exposure was evaluated using biomarkers of liver oxidative stress. In 6-week exposed mice, transcripts of nitric oxide synthase, inducible (*Nos2*), catalase (*Cat*), nuclear factor erythroid 2-related 2 (*Nfe2l2*), NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 (*Nqo1*), and heme oxygenase 1 (*Hmox1*) were elevated in mice fed RB+GB (Fig. 2B) and *Cat* levels were decreased in liver of mice fed RB-contaminated food. Superoxide dismutase [Cu-Zn] (*Sod1*), superoxide dismutase [Mn], mitochondrial (*Sod2*), and glutathione peroxidase 1 (*Gpx1*) relative levels were not modified. In 9-week exposed mice, *Nfe2l2* was upregulated in GB-exposed mice and *Nqo1* was overexpressed in mice exposed to RB and RB+GB. *Hmox1* transcription was increased in liver of mice fed RB, GB, and RB+GB. Liver MDA content, a marker of lipid peroxidation levels, was decreased in mice exposed to RB for 6 weeks, and increased in mice exposed to RB+GB for 6 weeks and to RB for 9 weeks (Fig. 2C). Therefore, in mice, the processes of detoxification and oxidative defense were altered by dietary exposure to PE microbeads.

3.3. Effect of PE microbeads on liver inflammation

H&E staining was used to analyze histological changes within liver tissues (Fig. 3A). No overt signs of necrosis, ballooning, edema, or hyperemia were observed. As focal inflammation is the most frequently observed inflammatory lesion of liver in rodent toxicity studies, the number and size of the inflammatory foci present in hepatic parenchyma were quantified (Oliveira et al., 2019) (Fig. 3A-B). Although the abundance of inflammatory foci was unmodified, their size was significantly increased in liver of mice exposed to RB+GB for 6 weeks compared to controls. After 9-week exposure, the inflammatory foci were more numerous in mice exposed to GB and RB+GB. There was a similar trend for the size of inflammatory foci with a significance threshold reached

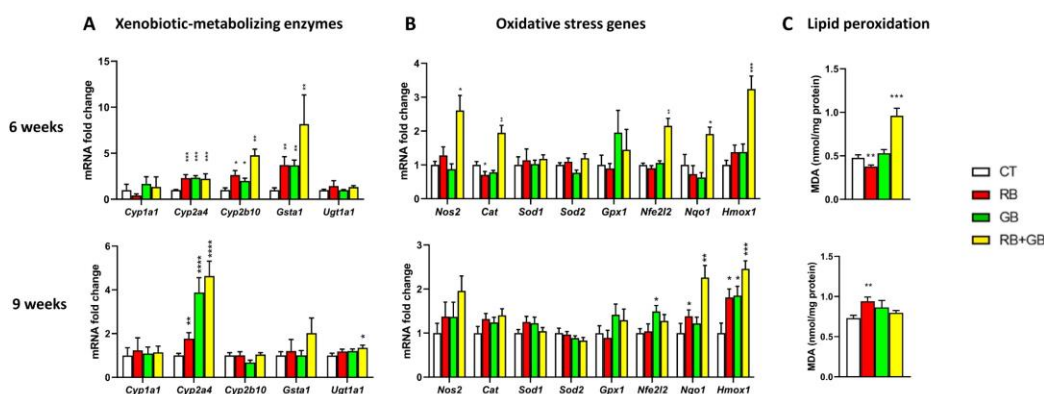


Fig. 2. Effects of polyethylene (PE) exposure on liver xenobiotic metabolism and oxidative stress markers. Mice were exposed to food spiked with 100 $\mu\text{g/g}$ of PE microbeads (red beads (RB), green beads (GB), or RB+GB; n = 10/group) or control food (CT; n = 10) for 6 and 9 weeks. Gene expression was quantified by RT-qPCR for (A) xenobiotic-metabolizing enzymes, and (B) oxidative stress genes. (C) Analysis of liver MDA levels. Upper panel: 6 weeks exposure. Lower panel: 9 weeks exposure. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, and **** $p < 0.001$ compared to the control group as determined by the Mann-Whitney U test.

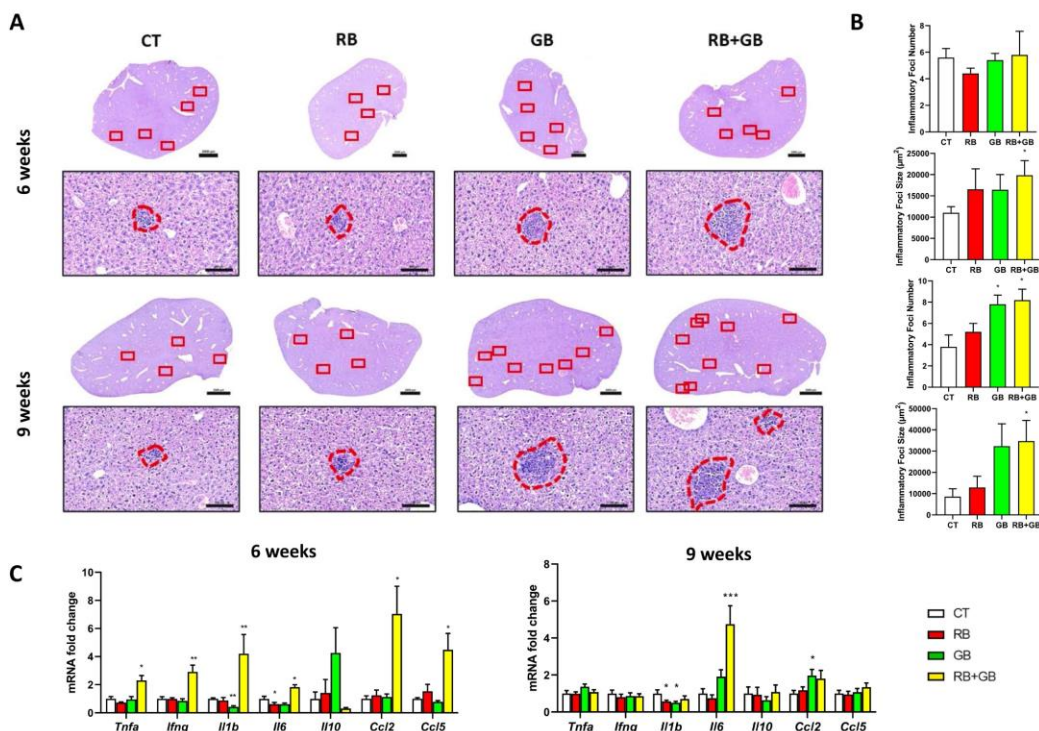


Fig. 3. Effects of polyethylene (PE) exposure on liver injury. Mice were exposed to food spiked with 100 $\mu\text{g/g}$ of PE microbeads (red beads (RB), green beads (GB), or RB+GB; $n = 10/\text{group}$) or control food (CT; $n = 10$) for 6 and 9 weeks. (A-B) Upper panel: 6 weeks exposure. Lower panel: 9 weeks exposure. (A) Representative pictures of liver sections stained with H&E. (B) Quantitative assessment of the number and size of inflammatory foci. (C) Gene expression of liver cytokines/chemokines. Left: 6 weeks exposure. Right: 9 weeks exposure. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, and **** $p < 0.001$ compared to the control group as determined by the Mann-Whitney U test.

for the RB+GB group. Major liver cytokines and chemokines were quantified at the transcriptional level (Fig. 3C). After 6-week exposure, the mRNA abundance of tumor necrosis factor (*Tnf*), interferon gamma (*Ifng*), interleukin-1 beta (*Il1b*), interleukin-6 (*Il6*), CC motif chemokine 2 (*Ccl2*), and C-C motif chemokine 5 (*Ccl5*) were increased in mice fed RB+GB compared to control mice. Decreased levels of *Il1b* and *Il6* transcripts were also quantified in GB- and RB-exposed mice, respectively. After 9-week exposure, downregulation of *Il1b* was observed in both RB- and GB-exposed mice. *Il6* levels were highly elevated in liver of mice fed RB+GB. *CCL2* mRNA was upregulated in GB-exposed mice. These results show that co-exposure to RB and GB PE microbeads induced low grade inflammation of the liver.

3.4. PE microbeads induce liver cell proliferation

Proliferation marker protein Ki-67 (*Mki67*) is a marker of cell division and its overexpression is an indicator of proliferation (Dubuquoy et al., 2015). Relative mRNA expression of *Mki67* was increased after 6-week exposure to RB+GB, and after 9-week exposure to GB and RB+GB (Fig. 4A). Immunohistochemical staining of Ki-67 protein confirmed the increased number of Ki-67-positive cells in liver of mice exposed to RB+GB, both after 6- and 9-week exposure (Fig. 4B), showing that dietary exposure to PE increased cell proliferation in liver. Because apoptosis can be induced to protect the liver from an overshooting proliferative response (Campana et al., 2021), and PS MP exposure has been shown to induce liver apoptosis (Li et al., 2021; S. Wang et al., 2023a), we sought to determine whether apoptosis was

affected in our experimental conditions (Fig. 4C). The TUNEL staining showed no modification of apoptosis by PE MP ingestion.

3.5. PE microbeads alter expression of hepatic cell markers

Markers of the main cell types in liver were quantified by RT-qPCR (Saleh et al., 2021; Yang et al., 2021). The levels of specific gene markers of hepatocytes, albumin (*Alb*) and hepatocyte nuclear factor 4-alpha (*Hnf4a*), were not modified after 6-week exposure but increased after 9-week exposure to RB+GB (Fig. 5A). The specific markers of cholangiocytes, hepatocyte nuclear factor 1-beta (*Hnf1b*) and transcription factor SOX-9 (*Sox9*), were increased in RB-exposed mice and decreased in GB-exposed mice after 6-week exposure (Fig. 5B). After 9-week exposure, *Hnf1b* mRNA was downregulated in GB-exposed mice and both *Hnf1b* and *Sox9* were decreased in mice fed RB+GB. The specific markers of hepatic stellate cells (HSCs), actin, aortic smooth muscle (*Acta2*) and platelet-derived growth factor subunit A (*Pdgfa*), were upregulated after 6-week exposure to RB+GB (Fig. 5C). After 9-week exposure, levels of *Pdgfa* were elevated in mice fed RB, GB, and RB+GB. The specific markers of portal fibroblasts, elastin (*Eln*) and Thy-1 membrane glycoprotein (*Thy1*), were unmodulated by dietary exposure to PE microbeads (Fig. 5D). The levels of the specific markers of Kupffer cells, macrophage marker (*Cd68*) and C-type lectin domain family 4 member F (*Clec4f*), were unaltered after 6-week exposure but either downregulated (*Cd68*) or upregulated (*Clec4f*) after 9-week exposure to GB microbeads.

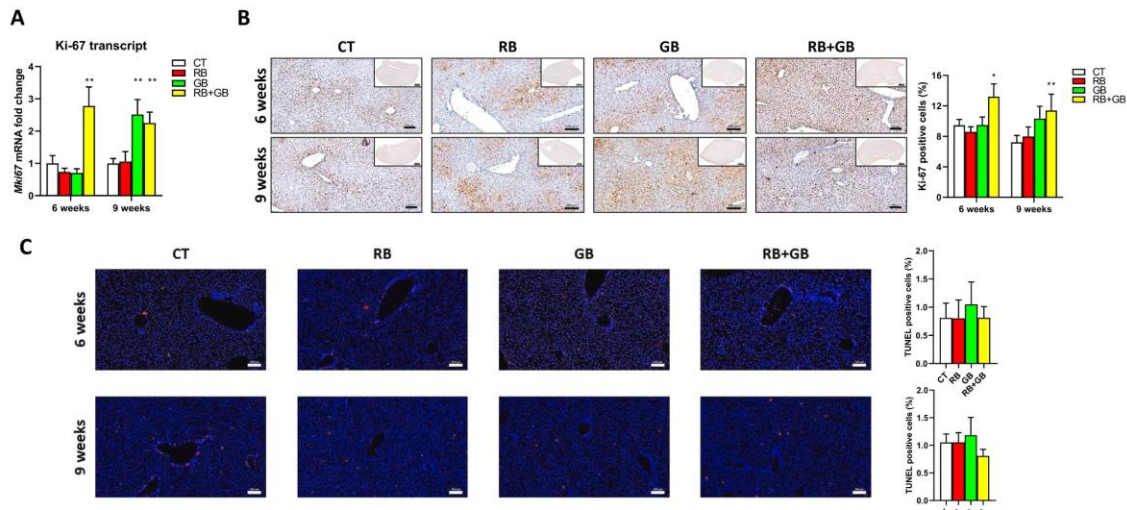


Fig. 4. Effects of polyethylene (PE) exposure on liver cell proliferation and apoptosis. Mice were exposed to food spiked with 100 µg/g of PE microbeads (red beads (RB), green beads (GB), or RB+GB; n = 10/group) or control food (CT; n = 10) for 6 and 9 weeks. (A) mRNA quantification of the proliferative marker Ki-67. (B) Representative pictures of Ki-67-stained liver and Ki-67 immunostaining quantification. (C) Representative pictures of TUNEL-stained liver and TUNEL immunostaining quantification * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, and **** $p < 0.001$ compared to the control group as determined by the Mann-Whitney U test.

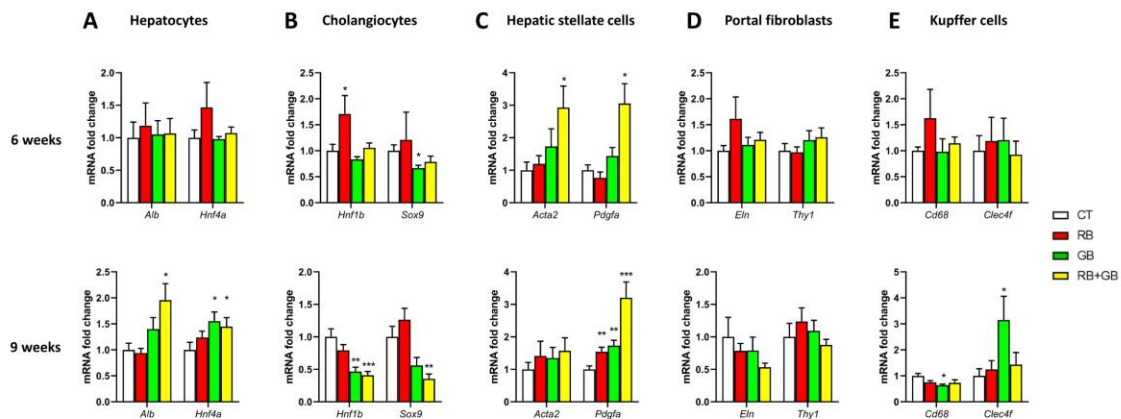


Fig. 5. Effects of polyethylene (PE) exposure on markers of main liver cell types. Mice were exposed to food spiked with 100 µg/g of PE microbeads (red beads (RB), green beads (GB), or RB+GB; n = 10/group) or control food (CT; n = 10) for 6 and 9 weeks. Gene quantification of cell type-specific biomarkers for (A) hepatocytes, (B) cholangiocytes, (C) hepatic stellate cells, (D) portal fibroblasts, and (E) Kupffer cells. Upper panel: 6 weeks exposure. Lower panel: 9 weeks exposure. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, and **** $p < 0.001$ compared to the control group as determined by the Mann-Whitney U test.

3.6. PE microbeads exacerbate the development of CCL₄-induced liver fibrosis

Since at least one HSC marker was upregulated after both 6 and 9 weeks of combined PE MP exposure, we performed sirius red staining to assess collagen deposition and therefore HSC activation (Fig. 6). Sirius red positive areas were increased in liver of mice exposed to GB for 6 weeks (Fig. 6A) and exposed to GB and RB+GB for 9 weeks (Fig. 6B). Since the activation of HSCs and their conversion into myofibroblasts play key roles in the development of liver fibrosis, we assessed the effects of dietary exposure to PE microbeads in a mouse model of induced liver fibrosis by repeated *i.p.* administration of CCL₄. All CCL₄-induced

groups showed a significant increase of serum AST and ALT activity levels compared to the control group (Fig. 7A). The elevated AST and ALT activity levels were significantly worsened in mice fed RB+GB compared to control mice. Sirius red staining and immunohistochemical staining of α -SMA were used to evaluate the degree of fibrosis (Fig. 7B). Results showed that collagen deposition and α -SMA protein were present in liver of mice repeatedly administered CCL₄, confirming the induction of hepatic fibrosis. This was also confirmed by the quantitative increase of both sirius red and α -SMA positive areas in all the CCL₄ fibrotic groups compared with the control group (Fig. 7C-D). Furthermore, the areas positive for sirius red and α -SMA were significantly increased in mice exposed to GB and RB+GB compared to fibrotic mice

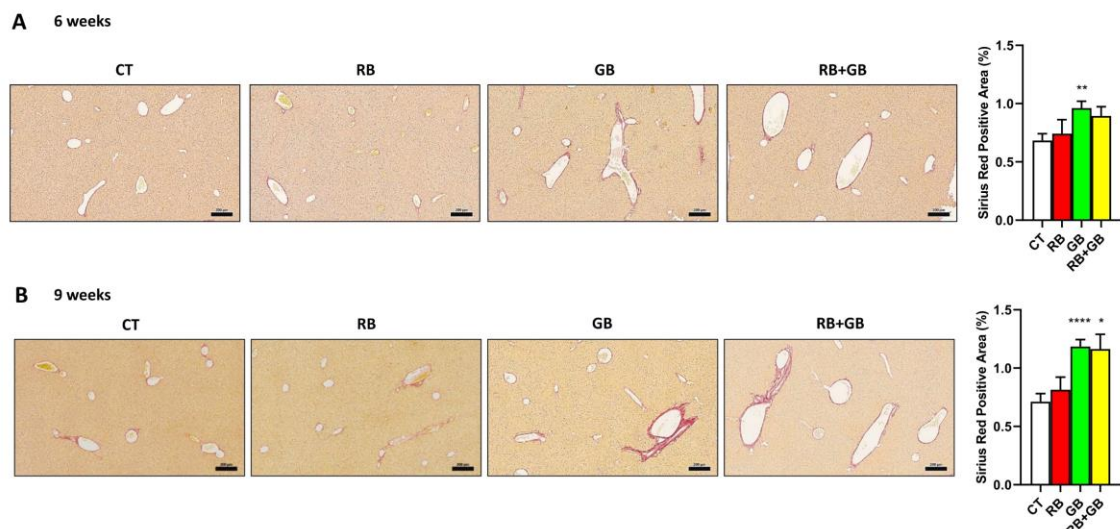


Fig. 6. Effects of polyethylene (PE) exposure on liver HSC activation. Mice were exposed to food spiked with 100 µg/g of PE microbeads (red beads (RB), green beads (GB), or RB+GB; n = 10/group) or control food (CT; n = 10) for 6 and 9 weeks. Representative images of liver sections stained with sirius red and sirius red-positive area quantification. A: 6 weeks exposure. B: 9 weeks exposure. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared to the control group as determined by the Mann-Whitney U test.

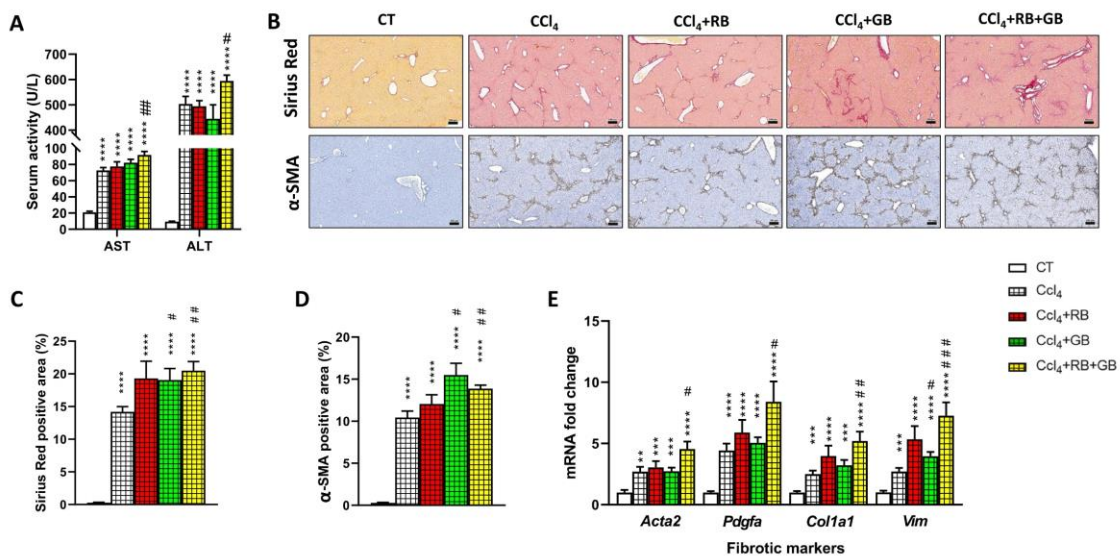


Fig. 7. Effects of polyethylene (PE) exposure on susceptibility to liver fibrosis. Mice were exposed to food spiked with 100 µg/g of PE microbeads (red beads (RB), green beads (GB), or RB+GB) or control food for 8 weeks (n = 8/group). Mice were administered carbon tetrachloride (CCl₄; 0.2 ml/kg bw) to induce liver fibrosis or olive oil as a control (CT) by *i.p.* injection once a week for 8 weeks. (A) Serum alanine transaminase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activity levels. (B) Representative images of liver sections stained with sirius red (upper panel) and α -SMA (lower panel). (C) Sirius red-positive area quantification. (D) α -SMA-positive area quantification. (E) mRNA quantification of liver fibrotic markers. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, and **** $p < 0.001$ compared to the control group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, and ### $p < 0.005$ compared to the CCl₄ group, as determined by the Mann-Whitney U test.

exposed to uncontaminated food. Consistent with these results, biomarkers of hepatic fibrosis, including *Acta2*, *Pdgfa*, collagen alpha-1(I) chain (*Col1a1*), and vimentin (*Vim*), were significantly upregulated in the 4 groups of mice repeatedly exposed to CCl₄ (Fig. 7E). Exposure to

GB enhanced the upregulation of *Vim* in liver as compared to control food. Exposure to RB+GB significantly enhanced the expression of *Acta2*, *Pdgfa*, *Col1a1*, and *Vim* transcripts in liver. As a whole, these results show that dietary PE exposure exacerbated CCl₄-induced liver

fibrosis.

4. Discussion

PE is the second-most commonly used commercial polymer. It is used in various industries, including agricultural mulches, composite materials, and packaging (El-Sherif et al., 2022). PE is the predominant polymer in personal care products as well as marine samples (Akanyange et al., 2022), and among the most frequently detected MP polymers in food, water, and beverages (Vitali et al., 2022). Increasing evidence indicates that dietary exposure to PE MPs alters morphology, mucin release, and immune and inflammatory responses in the gut (Djouina et al., 2022a; Li et al., 2020; Sun et al., 2021). Moreover, it disturbs intestinal microbiota composition and metabolism (Djouina et al., 2022a; Li et al., 2020; Sun et al., 2021). However, less is known about the effects of PE on liver. In this study, we evaluated the hepatotoxicity of PE MPs after 6- and 9-week exposures. Two different average sizes of PE microbeads were used, 36 μm (RB) and 116 μm (GB), either individually or in combination. Since hallmarks of hepatotoxicity have been described following mouse exposure to MPs composed of other polymers, we investigated whether PE RB and GB can cause similar adverse hepatic effects.

The PE MPs studied are of 36 and 116 μm average diameter size. The 2 types of MPs were chosen in order to reproduce what has been detected in human feces (N. Zhang et al., 2021b). There was about a 3-fold difference in diameter between the 2 types of MPs, in order to raise the issue of size-dependency of MP hepatotoxic effects. No parameter showed opposite variation between 36 and 116 μm MPs. The variations observed in our study were either common or specific to the 2 types of MPs. For example, after 9-week exposure, the increase of *Cd36*, *Acaca*, and *Mtp* was common between 36 and 116 μm MPs, the downregulation of *Fabp1* and *Acox1* was specific to 36 μm MPs, and the upregulation of *Slc27a2*, *Cpt1a*, *Pparg*, *Gpam* was specific to 116 μm MPs. At first glance, the dissimilarity between 36 and 116 μm MPs cannot be explained by a difference in the cell internalization pathway, since the 2 types of MPs are too large to be internalized by liver or immune cells (Beijer et al., 2022; Stock et al., 2021). However, our data do not allow to determine whether the administered MPs were degraded by digestion, which would have resulted in bringing liver cells into contact with MPs of internalizable size. Literature data on the fate of ingested PM are contradictory. *In vitro*, two studies argue against PE degradation through digestion. Stock et al. showed that artificial *in vitro* digestion of 4 μm PS particles modified their surface and increased their size. Such changes did not occur for 67 μm PP, 136 μm PVC, 60 μm PET, and notably 90 μm PE MPs (Stock et al., 2020). Fournier et al. exposed 1–10 μm PE MPs to the mucosal artificial colon M-ARCOL, a one-stage fermentation system, which simulates the mean physico-chemical and microbial parameters of the human colon, including not only the luminal but also mucosal microbiota through an external mucin-alginate beads compartment. They did not observe major changes in the polymeric surface composition of PE MPs (Fournier et al., 2023). By contrast, Tamargo et al. subjected PET MPs to digestion simulation in a standardized *in vitro* static model and to gut-microbial dynamic fermentation using the *simgi*® model. They observed structural degradation of the PET MPs during the gastrointestinal digestion (Tamargo et al., 2022). *In vivo*, the studies have reported inconsistent findings on liver accumulation of smaller MPs as compared with the one used in the current work. In a first study, Deng et al. showed that both 5 and 20 μm PS MP accumulated in liver after 28-day oral exposure (Deng et al., 2017). By contrast, after 21 weeks of exposure to the PS MPs (40–100 μm), no notable accumulation of MPs was observed in the gut or liver, although mice exhibited gut microbiota dysbiosis, tissue inflammation, and plasma lipid metabolism disorder (Deng et al., 2022). Lee et al. exposed mice to 10–50 μm PE MPs for 28 days. No particles were detected in the liver, spleen, kidney, or heart, while MPs were found in lung, stomach, duodenum, ileum, and serum (Lee et al., 2022).

Lastly, the findings of Zaheer et al. suggested that, in mice fed with 10–20 μm PE MPs for 1 week, PE MPs digested in the stomach were deposited into the gut, and the smaller-sized PE fragments transitioned and accumulated in the brain (Zaheer et al., 2022). In view of these studies, it seems unlikely that PE MPs reached the liver in our experimental conditions. Therefore, the effects are more likely to be mediated indirectly, in particular through the effects of MPs on dysbiosis and intestinal immunity, themselves differently impacted depending on the size of the ingested MPs (Djouina et al., 2022b).

In the current work, two times of exposure, 6 or 9 weeks, were evaluated. The effects of MP exposure are known to be time-dependent (Dolar et al., 2022; Shi et al., 2022; Xue et al., 2021), and our aim was to identify common effects between both exposure time and therefore to highlight and rather focus on long lasting effects. After 6-week exposure, 36 μm PE MP exposure decreased liver lipid peroxidation, whereas it increased it after 9-week exposure. The time-dependent effects of MP on oxidative stress has been previously reported in earthworm and bivalves (Lackmann et al., 2022; Z. Li et al., 2022; L. Li et al., 2022). In liver of mice exposed for 1 week to 1 μm PS MP, the major metabolic response was related to oxidative stress, which was no longer the case after 2-week exposure (Shi et al., 2022). Our findings further confirm that MPs exert a time-dependent effect on liver oxidative and antioxidative balance.

Results showed that PE ingestion enhanced the transcriptional expression of several genes involved in fatty acid metabolism. Most notably, *Acaca* was elevated in mice exposed to both PE microbeads either individually or in combination and at both endpoints. This gene is responsible for catalyzing the rate-limiting step of *de novo* lipogenesis and regulates fatty acid β -oxidation in hepatocyte (Bates et al., 2020). In addition to its role of lipid accumulation in hepatocytes, *ACACA* promotes HSC activation and thus fibrosis, which is in accordance with our results regarding HSC and fibrosis. PE ingestion also led to increased cholesterol and triglyceride levels.

Liver lipid metabolism has previously been studied in response to PS MP ingestion. In contrast to PE, ingestion of PS MPs in drinking water (100 and 1000 $\mu\text{g}/\text{l}$ for 5 weeks) decreased *Cd36* and *Pparg* mRNA expression, leading to decreased triglyceride and total cholesterol liver accumulation (Lu et al., 2018). Aged PS MPs were shown to decrease relative mRNA expression of liver *Srebp1c*, *Fasn*, and *Scd1*, favoring a decrease of lipid accumulation in liver similarly to PS MPs (Yang et al., 2022). It is important to note that the latter study observed these outcomes only in female mice, indicating that the effects of PS MPs in liver lipid metabolism are sex-specific. Moreover, maternal exposure to PS MPs in drinking water during gestation decreased total cholesterol hepatic levels in both male and female offspring, which was associated with downregulation of numerous genes involved in fatty acid uptake, β -oxidation, and synthesis (Luo et al., 2019). Similarly, PVC ingestion (0.5 mg/day for 60 days) induced decreased hepatic triglyceride levels (Chen et al., 2022). Therefore, the effects of PE appear to be opposite compared to PS and PVC, since our data supports hepatic lipid accumulation by PE. The effect on lipid digestion is also different between types of polymers. Using an *in vitro* gastrointestinal digestion model, PS, PET, PE, PVC, and polylactic-co-glycolic acid reduced lipid digestion, and PS had the strongest inhibition (Tan et al., 2020). In this study, two mechanisms were identified for PS effects on lipid digestion: (1) PS MPs decreased the bioavailability of lipid droplets via forming large lipid-MPs heteroaggregates due to the high MP hydrophobicity; and (2) PS MPs adsorbed lipase, and reduced its activity by changing the secondary structure and disturbing the essential open conformation. Further studies are needed to better understand how polymers interact with lipids.

Ingestion of PE significantly induced the expression of xenobiotic metabolizing enzyme expression. For example, *Cyp2a4* expression was upregulated by both RB and GB, either individually or in combination, at 6- and 9-week exposures. *CYP2A4* expression is strongly female-biased (female/male ratio of ~ 1000) and catalyzes testosterone

hydroxylation (Nail et al., 2021). CYP2A4 has a broad substrate specificity, including steroid hormones, lipids, and other xenobiotics such as cadmium (Wang et al., 2022). Other liver defense mechanisms include genes encoding nitric oxide synthase 2 and catalase as well as *Nfe2l2*, *Nqo1*, and *Hmox1*. PE ingestion modulates genes that regulate oxidative stress, which is consistent with other studies that show liver oxidative damage following ingestion of PS MPs (Li et al., 2021; Mu et al., 2022), PS nanospheres (Yasin et al., 2022), and PVC MPs (Chen et al., 2022).

Our results demonstrate that PE can induce low-grade inflammation in liver as shown by the increased presence of hepatic inflammatory foci and upregulation of inflammatory cytokines. Similarly, exposure to PS MPs (500 and 1000 mg/l) caused IL-1 β secretion in liver (Mu et al., 2022), and exposure to PS MPs (0.5 mg/mouse) increased the infiltration of natural killer cells and macrophages to non-parenchymal liver cells and dysregulated the expression of several cytokines (Zhao et al., 2021). Although pro-oxidative and pro-inflammatory effects are predominant in hepatic response to PE MP exposure, anti-inflammatory response was also observed. For example, 116 μ m PE MP exposure led to IL1b downregulation after 6- and 9-week exposure. These findings are in accordance with results obtained with human cell lines, showing that PE MP exposure induced pro-inflammatory cytokine response in keratinocytes, whereas opposite effect was observed in THP-1 and U937 immune cells (Gautam et al., 2022). The MP induced cell-specific immune modulation remains to be elucidated.

PE MP ingestion led to hyperproliferation of the liver which can have potential consequences for the promotion of hepatocarcinogenesis. Based on hepatic cell markers and collagen deposition staining, our data suggests that HSCs could be the target of hyperproliferation which prompted an investigation into the effects of PE ingestion on liver fibrosis susceptibility. PE exposure was found to increase the severity of CCl₄-induced hepatic fibrosis, which is based on data showing a significant elevation of collagen and α -SMA deposition in liver as well as enhanced expression of several fibrotic markers.

Shen et al. demonstrated that PS MPs administrated at either 0.1 or 1 mg/l in drinking water for 60 days was sufficient to induce development of severe liver fibrosis in mice. In contrast, sub-chronic PE dietary contamination induced weak liver fibrosis under healthy conditions, and worsened fibrogenesis under profibrotic conditions. It is not possible at this time to determine whether these dissimilarities on fibrosis outcomes were due to differences in experimental design or chemical differences in the polymers. Other studies have also shown that polymer MPs can worsen preconditions. For example, exposure to PS was shown to exacerbate cyclophosphamide and acetaminophen-induced liver injury (Liu et al., 2022; Wen et al., 2022). Moreover, PS NPs potentiated the development of hepatic fibrosis in mice fed a high-fat diet (Z. Li et al., 2022; L. Li et al., 2022). These results raise concerns that MP exposure could aggravate pre-existing liver pathologies in susceptible individuals.

More research is necessary to determine the human relevance of these results. Recent studies, however, have started to explore the effects of PS in human pluripotent stem cell-derived liver organoids (Cheng et al., 2022a, 2022b). Several hallmarks of hepatotoxicity, such as increased inflammation and compromised antioxidative balance, observed in vivo have been confirmed in human liver organoids. Fatty acid β -oxidation inhibition leading to steatosis was also consistently observed in mouse studies and in human liver organoids. In addition, an increase in the fibrotic marker *Col1a1* was also detected in liver organoids (Cheng et al., 2022a).

5. Conclusion

In summary, the present study demonstrated that PE MP food contamination alters defense mechanisms and promotes lipid accumulation, low-grade inflammation, and cell proliferation in mouse liver. Dietary PE exposure worsened fibrogenesis in a model of CCl₄-induced liver fibrosis. This study shows that PE exposure, similarly to PS, can lead to adverse effects in the liver. Overall, these findings confirm that

ubiquitous contamination by MPs has the potential to contribute to the aggravation of chronic liver pathologies.

Funding sources

This study was supported by the French Region Hauts-de-France.

CRedit authorship contribution statement

Madjid Djouina: Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft. **Christophe Waxin:** Formal analysis, Investigation. **Laurent Dubuquoy:** Writing – review & editing, Funding acquisition. **David Launay:** Funding acquisition. **Cécile Vignal:** Writing – review & editing, Funding acquisition. **Mathilde Body-Malapel:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Writing – original draft, Supervision, Funding 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 Guillaume Duflos from ANSES – Laboratoire de Sécurité des Aliments for providing the PE microbeads. We also thank Meryem Tardivel and Marie-Hélène Gevaert from Platforms Lilloises in Biology and Health (PLBS) - UMS 2014 - US 41 for technical assistance on analysis and section cutting, respectively, as well as Thomas Hubert and the staff of the animal facility of Lille, for animal care. We thank François Maggioletto for technical assistance. Editorial assistance, in the form of language editing and correction, was provided by XpertScientific Editing and Consulting Services.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.ecoenv.2023.115417](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115417).

References

- Akanyange, S.N., Zhang, Y., Zhao, X., Adom-Asamoah, G., Ature, A.-R.A., Anning, C., Tianpeng, C., Zhao, H., Lyu, X., Crittenden, J.C., 2022. A holistic assessment of microplastic ubiquitousness: Pathway for source identification in the environment. *Sustain. Prod. Consum.* 33, 113–145. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2022.06.020>.
- Bai, C.-L., Liu, L.-Y., Hu, Y.-B., Zeng, E.Y., Guo, Y., 2022. Microplastics: A review of analytical methods, occurrence and characteristics in food, and potential toxicities to biota. *Sci. Total Environ.* 806, 150263 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150263>.
- Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernández, J.A., Dombrowski, Y., McArt, D.G., Dunne, P. D., McQuaid, S., Gray, R.T., Murray, L.J., Coleman, H.G., James, J.A., Salto-Tellez, M., Hamilton, P.W., 2017. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* 7, 16878. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>.
- Bates, J., Vijayakumar, A., Ghoshal, S., Marchand, B., Yi, S., Korniyev, D., Zagorska, A., Hollenback, D., Walker, K., Liu, K., Pendem, S., Newstrom, D., Brockett, R., Mikaelian, I., Kusam, S., Ramirez, R., Lopez, D., Li, L., Fuchs, B.C., Breckenridge, D. G., 2020. Acetyl-CoA carboxylase inhibition disrupts metabolic reprogramming during hepatic stellate cell activation. *J. Hepatol.* 73, 896–905. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.037>.
- Beijer, N.R.M., Dehaut, A., Carlier, M.P., Wolter, H., Versteegen, R.M., Pennings, J.L.A., de la Fonteyne, L., Niemann, H., Janssen, H.M., Timmermans, B.G., Mennes, W., Cassee, F.R., Mengelers, M.J.B., Amaral-Zettler, L.A., Duflos, G., Staal, Y.C.M., 2022. Relationship Between Particle Properties and Immunotoxicological Effects of Environmentally-Sourced Microplastics. *Front. Water* 4.

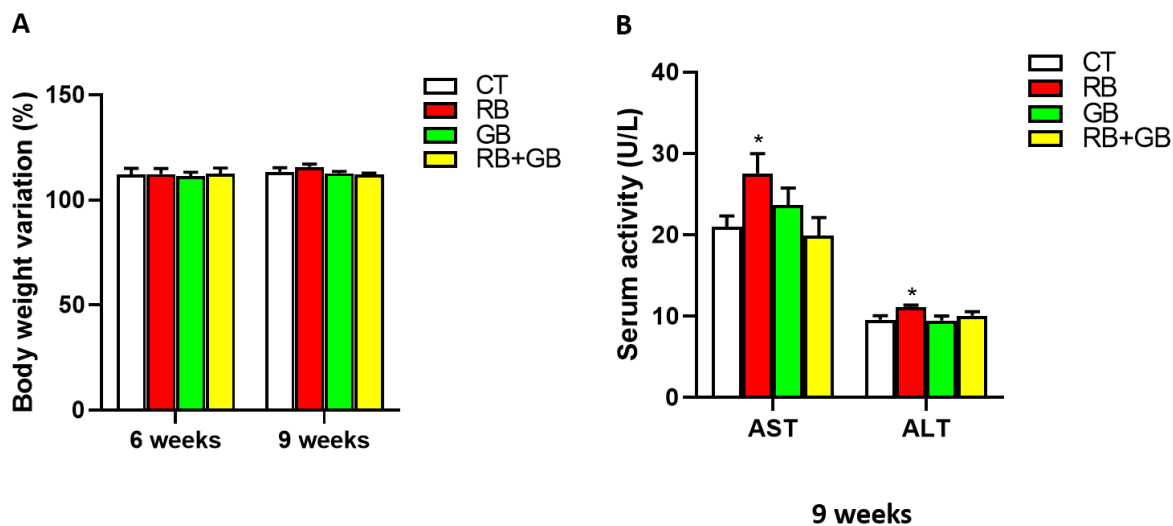
- Braun, T., Ehrlich, L., Henrich, W., Koepfel, S., Lomako, I., Schwabl, P., Liebmann, B., 2021. Detection of microplastic in human placenta and meconium in a clinical setting. *Pharmaceutics* 13, 921. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13070921>.
- Campana, L., Esser, H., Huch, M., Forbes, S., 2021. Liver regeneration and inflammation: from fundamental science to clinical applications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22, 608–624.
- Chen, X., Zhuang, J., Chen, Q., Xu, L., Yue, X., Qiao, D., 2022. Chronic exposure to polyvinyl chloride microplastics induces liver injury and gut microbiota dysbiosis based on the integration of liver transcriptome profiles and full-length 16S rRNA sequencing data. *Sci. Total Environ.* 839, 155984 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155984>.
- Cheng, W., Li, X., Zhou, Y., Yu, H., Xie, Y., Guo, H., Wang, H., Li, Y., Feng, Y., Wang, Y., 2022a. Polystyrene microplastics induce hepatotoxicity and disrupt lipid metabolism in the liver organoids. *Sci. Total Environ.* 806, 150328 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150328>.
- Cheng, W., Zhou, Y., Xie, Y., Li, Y., Zhou, R., Wang, H., Feng, Y., Wang, Y., 2022b. Combined effect of polystyrene microplastics and bisphenol A on the human embryonic stem cells-derived liver organoids: The hepatotoxicity and lipid accumulation. *Sci. Total Environ.*, 158585 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158585>.
- da Costa Araújo, A.P., Gomes, A.R., Malafaia, G., 2020. Hepatotoxicity of pristine polyethylene microplastics in neotropical *Physalaemus cuvieri* tadpoles (Fitzinger, 1826. *J. Hazard. Mater.* 386, 121992.
- Deng, Y., Zhang, Y., Lemos, B., Ren, H., 2017. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Sci. Rep.* 7, 46687. <https://doi.org/10.1038/srep46687>.
- Deng, Y., Chen, H., Huang, Y., Zhang, Y., Ren, H., Fang, M., Wang, Q., Chen, W., Hale, R. C., Galloway, T.S., Chen, D., 2022. Long-Term Exposure to Environmentally Relevant Doses of Large Polystyrene Microplastics Disturbs Lipid Homeostasis via Bowel Function Interference. *Environ. Sci. Technol.* 56, 15805–15817. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c07933>.
- Djouina, M., Vignal, C., Dehaut, A., Caboche, S., Hirt, N., Waxin, C., Himber, C., Beury, D., Hot, D., Dubuquoy, L., Launay, D., Duflos, G., Body-Malapel, M., 2022a. Oral exposure to polyethylene microplastics alters gut morphology, immune response, and microbiota composition in mice. *Environ. Res.* 212, 113230 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113230>.
- Djouina, M., Vignal, C., Dehaut, A., Caboche, S., Hirt, N., Waxin, C., Himber, C., Beury, D., Hot, D., Dubuquoy, L., Launay, D., Duflos, G., Body-Malapel, M., 2022b. Oral exposure to polyethylene microplastics alters gut morphology, immune response, and microbiota composition in mice. *Environ. Res.* 212, 113230 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113230>.
- Dolar, A., Drobne, D., Dolenc, M., Marinišek, M., Jemec Kocalj, A., 2022. Time-dependent immune response in Porcellio scaber following exposure to microplastics and natural particles. *Sci. Total Environ.* 818, 151816 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151816>.
- Dong, R., Zhou, C., Wang, S., Yan, Y., Jiang, Q., 2022. Probiotics ameliorate polyethylene microplastics-induced liver injury by inhibition of oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish. Shellfish Immunol.* 130, 261–272.
- Dubuquoy, L., Louvet, A., Lassailly, G., Truant, S., Boleslawski, E., Artru, F., Maggioletto, F., Gantier, E., Buob, D., Leteurtre, E., Cansson, A., Dharancy, S., Moreno, C., Pruvot, F.-R., Battaler, R., Mathurin, P., 2015. Progenitor cell expansion and impaired hepatocyte regeneration in explanted livers from alcoholic hepatitis. *Gut* 64, 1949–1960. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308410>.
- El-Sherif, D.M., Eloffy, M.G., Elmesery, A., Abouzid, M., Gad, M., El-Seedi, H.R., Brinkmann, M., Wang, K., Al Naggar, Y., 2022. Environmental risk, toxicity, and biodegradation of polyethylene: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 29, 81166–81182. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23382-1>.
- Ferronato, N., Torretta, V., 2019. Waste Mismanagement in Developing Countries: A Review of Global Issues. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16, 1060. <https://doi.org/10.3390/ijerph16061060>.
- Fournier, E., Leveque, M., Ruiz, P., Ratel, J., Durif, C., Chalancon, S., Amiard, F., Edely, M., Bezirard, V., Gaultier, E., Lamas, B., Houdeau, E., Lagarde, F., Engel, E., Etienne-Mesmin, L., Blanquet-Diot, S., Mercier-Bonin, M., 2023. Microplastics: What happens in the human digestive tract? First evidences in adults using in vitro gut models. *J. Hazard. Mater.* 442, 130010 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130010>.
- Gasperi, J., Wright, S.L., Dris, R., Collard, F., Mandin, C., Guerroauche, M., Langlois, V., Kelly, F.J., Tassin, B., 2018. Microplastics in air: Are we breathing it in? *Curr. Opin. Environ. Sci. Health, Micro and Nanoplastics* Edited by Dr. Teresa A.P. Rocha-Santos 1, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2017.10.002>.
- Gautam, R., Jo, J., Acharya, M., Maharjan, A., Lee, D., K.C. P.B., Kim, C., Kim, K., Kim, H., Heo, Y., 2022. Evaluation of potential toxicity of polyethylene microplastics on human derived cell lines. *Sci. Total Environ.* 838, 156089 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156089>.
- Hirt, N., Body-Malapel, M., 2020. Immunotoxicity and intestinal effects of nano-and microplastics: a review of the literature. *Part. Fibre Toxicol.* 17, 1–22. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00387-7>.
- Horvatis, T., Tamminga, M., Liu, B., Sebode, M., Carambia, A., Fischer, L., Püschel, K., Huber, S., Fischer, E.K., 2022. Microplastics detected in cirrhotic liver tissue. *eBioMedicine* 82, 104147. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104147>.
- Hu, J., Zuo, J., Li, J., Zhang, Y., Ai, X., Zhang, J., Gong, D., Sun, D., 2022. Effects of secondary polyethylene microplastic exposure on crucian (*Carassius carassius*) growth, liver damage, and gut microbiome composition. *Sci. Total Environ.* 802, 149736 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149736>.
- Huang, D., Zhang, Y., Long, J., Yang, X., Bao, L., Yang, Z., Wu, B., Si, R., Zhao, W., Peng, C., Wang, A., Yan, D., 2022. Polystyrene microplastic exposure induces insulin resistance in mice via dysbacteriosis and pro-inflammation. *Sci. Total Environ.* 838, 155937 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155937>.
- Ibrahim, Y.S., Anuar, S.T., Azmi, A.A., Khalik, W.M.A.W.M., Lehata, S., Hamzah, S.R., Ismail, D., Ma, Z.F., Dzulkarnaen, A., Zakaria, Z., Mustaffa, N., Sharif, S.E.T., Lee, Y. Y., 2021. Detection of microplastics in human colectomy specimens. *JGH Open* 5, 116–121. <https://doi.org/10.1002/jgh3.12457>.
- Im, C., Kim, H., Zaheer, J., Kim, J.Y., Lee, Y.-J., Kang, C.M., Kim, J.S., 2022. PET Tracing of Biodistribution for Orally Administered 64Cu-Labeled Polystyrene in Mice. *J. Nucl. Med.* 63, 461–467. <https://doi.org/10.2967/jnumed.120.256982>.
- Lackmann, C., Velki, M., Šimić, A., Müller, A., Braun, U., Ećimović, S., Hollert, H., 2022. Two types of microplastics (polystyrene-HBCD and car tire abrasion) affect oxidative stress-related biomarkers in earthworm *Eisenia andrei* in a time-dependent manner. *Environ. Int.* 163, 107190 <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107190>.
- Lee, Sijoon, Kang, K.-K., Sung, S.-E., Choi, J.-H., Sung, M., Seong, K.-Y., Lee, Sunjong, Yang, S.Y., Seo, M.-S., Kim, K., 2022. Toxicity study and quantitative evaluation of polyethylene microplastics in ICR mice. *Polymers* 14, 402. <https://doi.org/10.3390/polym14030402>.
- Leslie, H.A., van Velzen, M.J.M., Brandsma, S.H., Vethaak, A.D., Garcia-Vallejo, J.J., Lamoree, M.H., 2022. Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environ. Int.* 163, 107199 <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107199>.
- Li, B., Ding, Y., Cheng, X., Sheng, D., Xu, Z., Rong, Q., Wu, Y., Zhao, H., Ji, X., Zhang, Y., 2020. Polyethylene microplastics affect the distribution of gut microbiota and inflammation development in mice. *Chemosphere* 244, 125492. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125492>.
- Li, L., Xu, M., He, C., Wang, H., Hu, Q., 2022. Polystyrene nanoplastics potentiate the development of hepatic fibrosis in high fat diet fed mice. *Environ. Toxicol.* 37, 362–372. <https://doi.org/10.1002/tox.23404>.
- Li, S., Shi, M., Wang, Y., Xiao, Y., Cai, D., Xiao, F., 2021. Keap1-Nrf2 pathway up-regulation via hydrogen sulfide mitigates polystyrene microplastics induced-hepatotoxic effects. *J. Hazard. Mater.* 402, 123933 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123933>.
- Li, Z., Chang, X., Hu, M., Fang, J.K.-H., Sokolova, I.M., Huang, W., Xu, E.G., Wang, Y., 2022. Is microplastic an oxidative stressor? Evidence from a meta-analysis on bivalves. *J. Hazard. Mater.* 423, 127211 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127211>.
- Lim, X., 2021. Microplastics are everywhere - but are they harmful? *Nature* 593, 22–25. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-01143-3>.
- Liu, J., Zhang, L., Xu, F., Meng, S., Li, H., Song, Y., 2022. Polystyrene Microplastics Postpone APAP-Induced Liver Injury through Impeding Macrophage Polarization. *Toxics* 10, 792. <https://doi.org/10.3390/toxics10120792>.
- Lu, L., Wan, Z., Luo, T., Fu, Z., Jin, Y., 2018. Polystyrene microplastics induce gut microbiota dysbiosis and hepatic lipid metabolism disorder in mice. *Sci. Total Environ.* 631–632, 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.051>.
- Lu, X., Zhang, J.-X., Zhang, L., Wu, D., Tian, J., Yu, L.-J., He, L., Zhong, S., Du, H., Deng, D.-F., 2022. Negative impacts of chronic dietary exposure to polyethylene microplastics on growth, gut microbiota, liver metabolism and gene expressions in genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Sci. Total Environ.*, 156571.
- Luo, T., Zhang, Y., Wang, C., Wang, X., Zhou, J., Shen, M., Zhao, Y., Fu, Z., Jin, Y., 2019. Maternal exposure to different sizes of polystyrene microplastics during gestation causes metabolic disorders in their offspring. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 (255), 113122. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113122>.
- Luo, T., Wang, D., Zhao, Y., Li, X., Yang, G., Jin, Y., 2022. Polystyrene microplastics exacerbate experimental colitis in mice tightly associated with the occurrence of hepatic inflammation. *Sci. Total Environ.* 844, 156884 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156884>.
- Luqman, A., Nugrahapraja, H., Wahyuno, R.A., Islami, I., Haekal, M.H., Fardiansyah, Y., Putri, B.Q., Amalludin, F.I., Rofiq, E.A., Götz, F., Wibowo, A.T., 2021. Microplastic Contamination in Human Stools, Foods, and Drinking Water Associated with Indonesian Coastal Population. *Environments* 8, 138. <https://doi.org/10.3390/environments8120138>.
- Mak, C.W., Yeung, K.C.-F., Chan, K.M., 2019. Acute toxic effects of polyethylene microplastic on adult zebrafish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 182, 109442.
- Mohamed Nor, N.H., Kooi, M., Diepens, N.J., Koelmans, A.A., 2021. Lifetime Accumulation of Microplastic in Children and Adults. *Environ. Sci. Technol.* 55, 5084–5096. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07384>.
- Mortensen, N.P., Fennell, T.R., Johnson, L.M., 2021. Unintended human ingestion of nanoplastics and small microplastics through drinking water, beverages, and food sources. *NanoImpact* 21, 100302. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2021.100302>.
- Mu, Y., Sun, J., Li, Z., Zhang, W., Liu, Z., Li, C., Peng, C., Cui, G., Shao, H., Du, Z., 2022. Activation of pyroptosis and ferroptosis is involved in the hepatotoxicity induced by polystyrene microplastics in mice. *Chemosphere* 291, 132944. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132944>.
- Nail, A.N., Spear, B.T., Peterson, M.L., 2021. Highly homologous mouse Cyp2a4 and Cyp2a5 genes are differentially expressed in the liver and both express long non-coding antisense RNAs. *Gene* 767, 145162. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145162>.
- Oliveira, F.M.S., da Paixão Matias, P.H., Kraemer, L., Gazzinelli-Guimarães, A.C., Santos, F.V., Amorim, C.C.O., Nogueira, D.S., Freitas, C.S., Caliani, M.V., Bartholomeu, D.C., 2019. Comorbidity associated to *Ascaris suum* infection during pulmonary fibrosis exacerbates chronic lung and liver inflammation and dysfunction but not affect the parasite cycle in mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007896.
- Saleh, M.B., Louvet, A., Ntandja-Wandji, L.C., Boleslawski, E., Gnemmi, V., Lassailly, G., Truant, S., Maggioletto, F., Ningharhari, M., Artru, F., 2021. Loss of hepatocyte identity

- following aberrant YAP activation: a key mechanism in alcoholic hepatitis. *J. Hepatol.* 75, 912–923.
- Schwabl, P., Köppel, S., Königshofer, P., Bucsics, T., Trauner, M., Reiberger, T., Liebmann, B., 2019. Detection of various microplastics in human stool: a prospective case series. *Ann. Intern. Med.* <https://doi.org/10.7326/M19-0618>.
- Senathirajah, K., Attwood, S., Bhagwat, G., Carbery, M., Wilson, S., Palanisami, T., 2021. Estimation of the mass of microplastics ingested – A pivotal first step towards human health risk assessment. *J. Hazard. Mater.* 404, 124004 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124004>.
- Shi, C., Han, X., Guo, W., Wu, Q., Yang, X., Wang, Y., Tang, G., Wang, S., Wang, Z., Liu, Y., Li, M., Lv, M., Guo, Y., Li, Z., Li, J., Shi, J., Qu, G., Jiang, G., 2022. Disturbed Gut-Liver axis indicating oral exposure to polystyrene microplastic potentially increases the risk of insulin resistance. *Environ. Int.* 164, 107273 <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107273>.
- Song, Y.K., Hong, S.H., Jang, M., Han, G.M., Jung, S.W., Shim, W.J., 2017. Combined Effects of UV Exposure Duration and Mechanical Abrasion on Microplastic Fragmentation by Polymer Type. *Environ. Sci. Technol.* 51, 4368–4376. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b06155>.
- Stock, V., Fahrenson, C., Thuenemann, A., Dönmez, M.H., Voss, L., Böhmert, L., Braeuning, A., Lampen, A., Sieg, H., 2020. Impact of artificial digestion on the sizes and shapes of microplastic particles. *Food Chem. Toxicol.* 135, 111010 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111010>.
- Stock, V., Laurisch, C., Franke, J., Dönmez, M.H., Voss, L., Böhmert, L., Braeuning, A., Sieg, H., 2021. Uptake and cellular effects of PE, PP, PET and PVC microplastic particles. *Toxicol. Vitr.* 70, 105021 <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.105021>.
- Sun, H., Chen, N., Yang, X., Xia, Y., Wu, D., 2021. Effects induced by polyethylene microplastics oral exposure on colon mucin release, inflammation, gut microflora composition and metabolism in mice. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 220, 112340 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112340>.
- Sun, W., Jin, C., Bai, Y., Ma, R., Deng, Y., Gao, Y., Pan, G., Yang, Z., Yan, L., 2022. Blood uptake and urine excretion of nano- and micro-plastics after a single exposure. *Sci. Total Environ.* 848, 157639 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157639>.
- Tamargo, A., Molinero, N., Reinoso, J.J., Alcolea-Rodríguez, V., Portela, R., Bañares, M. A., Fernández, J.F., Moreno-Arribas, M.V., 2022. PET microplastics affect human gut microbiota communities during simulated gastrointestinal digestion, first evidence of plausible polymer biodegradation during human digestion. *Sci. Rep.* 12, 528. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04489-w>.
- Tan, H., Yue, T., Xu, Y., Zhao, J., Xing, B., 2020. Microplastics reduce lipid digestion in simulated human gastrointestinal system. *Environ. Sci. Technol.* 54, 12285–12294. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02608>.
- Vitali, C., Peters, R., Janssen, H.-G., Nielsen, M., W.F., 2022. Microplastics and nanoplastics in food, water, and beverages; part I. Occurrence. *TrAC Trends Anal. Chem.* 116670 <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116670>.
- Wang, H., Zhang, L., Xia, Z., Cui, J.Y., 2022. Effect of chronic cadmium exposure on brain and liver transporters and drug-metabolizing enzymes in male and female mice genetically predisposed to Alzheimer's Disease. *Drug Metab. Dispos.* 50, 1414–1428. <https://doi.org/10.1124/dmd.121.000453>.
- Wang, S., Wu, H., Shi, X., Wang, Y., Xu, S., 2023a. Polystyrene microplastics with different sizes induce the apoptosis and necroptosis in liver through the PTEN/PI3K/AKT/autophagy axis. *Sci. Total Environ.* 899, 165461 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165461>.
- Wang, X., Weng, Y., Geng, S., Wang, C., Jin, C., Shi, L., Jin, Y., 2023b. Maternal procyimdone exposure has lasting effects on murine gut-liver axis and glucolipid metabolism in offspring. *Food Chem. Toxicol.* 174, 113657 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113657>.
- Wen, S., Zhao, Y., Liu, S., Chen, Y., Yuan, H., Xu, H., 2022. Polystyrene microplastics exacerbated liver injury from cyclophosphamide in mice: Insight into gut microbiota. *Sci. Total Environ.* 840, 156668 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156668>.
- Wibowo, A.T., Nugrahapraja, H., Wahyuono, R.A., Islami, I., Haekal, M.H., Fardiansyah, Y., Sugiyo, P.W.W., Putro, Y.K., Fauzia, F.N., Santoso, H., Götz, F., Tangahu, B.V., Luqman, A., 2021. Microplastic Contamination in the Human Gastrointestinal Tract and Daily Consumables Associated with an Indonesian Farming Community. *Sustainability* 13, 12840. <https://doi.org/10.3390/su132212840>.
- Xue, Y.-H., Feng, L.-S., Xu, Z.-Y., Zhao, F.-Y., Wen, X.-L., Jin, T., Sun, Z.-X., 2021. The time-dependent variations of zebrafish intestine and gill after polyethylene microplastics exposure. *Ecotoxicology* 30, 1997–2010. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02469-4>.
- Yang, W., He, H., Wang, T., Su, N., Zhang, F., Jiang, K., Zhu, J., Zhang, C., Niu, K., Wang, L., Yuan, X., Liu, N., Li, L., Wei, W., Hu, J., 2021. Single-cell transcriptomic analysis reveals a hepatic stellate cell-activation roadmap and myofibroblast origin during liver fibrosis in mice. *Hepatol. Baltim Md* 74, 2774–2790. <https://doi.org/10.1002/hep.31987>.
- Yang, X., Jiang, J., Wang, Q., Duan, J., Chen, N., Wu, D., Xia, Y., 2022. Gender difference in hepatic AMPK pathway activated lipid metabolism induced by aged polystyrene microplastics exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 245, 114105 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114105>.
- Yasin, N.A.E., El-Naggar, M.E., Ahmed, Z.S.O., Galal, M.K., Rashad, M.M., Youssef, A.M., Elleithy, E.M.M., 2022. Exposure to Polystyrene nanoparticles induces liver damage in rat via induction of oxidative stress and hepatocyte apoptosis. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 94, 103911 <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103911>.
- Zaheer, J., Kim, H., Ko, I.O., Jo, E.-K., Choi, E.-J., Lee, H.-J., Shim, I., Woo, H., Choi, J., Kim, G.-H., Kim, J.S., 2022. Pre/post-natal exposure to microplastic as a potential risk factor for autism spectrum disorder. *Environ. Int.* 161, 107121 <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107121>.
- Zhang, J., Wang, L., Trasande, L., Kannan, K., 2021a. Occurrence of polyethylene terephthalate and polycarbonate microplastics in infant and adult feces. *Environ. Sci. Technol. Lett.* <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.1c00559>.
- Zhang, N., Li, Y.B., He, H.R., Zhang, J.F., Ma, G.S., 2021b. You are what you eat: Microplastics in the feces of young men living in Beijing. *Sci. Total Environ.* 767, 144345 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144345>.
- Zhao, L., Shi, W., Hu, F., Song, X., Cheng, Z., Zhou, J., 2021. Prolonged oral ingestion of microplastics induced inflammation in the liver tissues of C57BL/6J mice through polarization of macrophages and increased infiltration of natural killer cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 227, 112882 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112882>.
- Zheng, H., Wang, J., Wei, X., Chang, L., Liu, S., 2021. Proinflammatory properties and lipid disturbance of polystyrene microplastics in the livers of mice with acute colitis. *Sci. Total Environ.* 750, 143085 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143085>.

Supplementary File

Title

Oral exposure to polyethylene microplastics induces inflammatory and metabolic changes and promotes fibrosis in mouse liver.



Suppl Figure1: Effects of PE exposure on mice: Mice were exposed to food spiked with 100 $\mu\text{g/g}$ of PE microbeads (red beads (RB), green beads (GB), or RB+GB, n=10/group) or control food (CT; n=10) for 6 and 9 weeks. (A) Body weight variation and (B) Serum AST and ALT activity levels. * $p < 0.05$ compared to the control group as determined by the Mann-Whitney U test.

2.3. Conclusion de l'article 3

En résumé, cette étude met en évidence les effets de la contamination alimentaire par les microplastiques de polyéthylène sur le foie des souris. Elle démontre que cette contamination altère les mécanismes de défense, favorise l'accumulation de lipides, l'inflammation de bas grade et la prolifération cellulaire hépatique. De plus, l'exposition au polyéthylène par l'alimentation aggrave la fibrogénèse dans un modèle de fibrose hépatique induite par le CCl₄. Ces résultats confirment le potentiel des microplastiques ubiquitaires à contribuer à l'aggravation des pathologies hépatiques chroniques, soulignant ainsi la nécessité d'évaluer plus en détail les risques pour la santé humaine.

Discussion & perspectives générales

Les contaminants alimentaires constituent un problème de santé publique majeur à l'échelle mondiale. Ils sont présents dans une variété d'aliments que nous consommons quotidiennement, tels que les fruits, les légumes, les produits laitiers, les viandes et les céréales. Ces contaminants peuvent provenir de diverses sources, telles que les pesticides agricoles, les résidus de médicaments vétérinaires, les substances chimiques industrielles, les toxines microbiennes et les résidus de plastiques. Leur présence dans notre alimentation soulève des inquiétudes quant à leurs effets néfastes sur la santé humaine. En effet, une exposition prolongée à ces contaminants est fortement suspectée d'entraîner des problèmes de santé tels que des troubles métaboliques, des altérations du système immunitaire, des dysfonctionnements hormonaux, des dommages génétiques et même le développement de maladies chroniques comme le cancer, les maladies cardiovasculaires et les troubles neurologiques. Les contaminants alimentaires peuvent agir de différentes manières, en interférant avec les fonctions normales du corps, en provoquant des réactions inflammatoires, en perturbant l'équilibre hormonal ou en générant des composés toxiques. Par conséquent, il est essentiel de comprendre les risques associés à ces contaminants et de mettre en place des mesures de contrôle et de prévention pour protéger la santé des consommateurs.

Notre étude revêt une importance significative dans le contexte plus large de la toxicologie alimentaire et des impacts sur l'intestin et le foie. Les contaminants alimentaires sont une préoccupation croissante en raison de leur potentiel à causer des effets néfastes sur la santé humaine. En se concentrant spécifiquement sur l'impact des contaminants alimentaires sur l'intestin et le foie, notre étude apporte des informations importantes dans la compréhension de la toxicologie de ces organes vitaux.

L'intestin et le foie jouent des rôles essentiels dans le métabolisme et la détoxification des substances ingérées. Ils sont en contact direct avec les aliments et les contaminants qu'ils véhiculent, ce qui en fait des sites clés pour évaluer les effets de la toxicité alimentaire. Les cellules intestinales sont responsables de l'absorption des nutriments et des toxines, tandis que le foie est le principal organe de détoxification, filtrant les substances nocives du sang. Par conséquent, comprendre les effets des contaminants alimentaires sur l'intestin et le foie est crucial pour évaluer leur impact sur la santé humaine globale.

Nos études contribuent à cette compréhension en examinant spécifiquement les effets du déoxynivalénol, un contaminant courant dans les céréales, sur l'entérite et le développement du cancer colorectal chez la souris. De plus, notre étude sur l'impact des

microplastiques montre également les effets du polyéthylène sur l'intestin et le foie dans des conditions saines, ainsi que sur la fibrose dans des modèles murins. Ces deux contaminants sont pertinents dans le contexte de la toxicologie alimentaire car ils sont présents dans notre environnement alimentaire quotidien et suscitent de plus en plus de préoccupations quant à leurs potentiels effets néfastes sur la santé digestive.

1. Analyse et discussion de l'impact du déoxynivalénole sur l'intestin en condition pathologique

Le DON est une mycotoxine couramment présente dans notre alimentation, en particulier dans les produits céréaliers. En raison de sa résistance aux différents processus de transformation des aliments, le DON est fréquemment retrouvé dans les denrées que nous consommons quotidiennement. Des études antérieures ont déjà mis en évidence les effets nocifs de cette mycotoxine sur l'intestin et le foie. Malgré les limites réglementaires établies pour restreindre l'exposition humaine à une dose journalière tolérable de 1 µg/kg de poids corporel, de plus en plus de recherches suggèrent que le DON peut avoir des conséquences néfastes sur la santé, même à cette dose. En 2018, nous avons publié une étude mettant en évidence les effets du DON sur l'équilibre intestinal à des doses pertinentes pour une exposition chronique chez l'humain (article inclus dans la partie annexe). Nous avons observé une augmentation des cytokines inflammatoires et une hyperprolifération des cellules de la muqueuse (Vignal et al., 2018). Cependant, peu d'études ont exploré l'impact de cette mycotoxine dans des contextes pathologiques tels que l'inflammation intestinale et le cancer.

Compte tenu des effets observés du DON sur des animaux en état de santé normal, il était essentiel d'étudier son impact sur des sujets vulnérables. En raison de ses propriétés immunosuppressives et de son effet d'hyperprolifération, nous avons donc entrepris cette étude en utilisant deux modèles de pathologies intestinales : l'entérite induite par l'indométacine et le cancer colorectal associé à la colite induite par le DSS et l'AOM.

Dans cette étude, nous avons sélectionné des doses représentatives de l'exposition humaine réaliste, soit 10 et 100 µg/kg de poids corporel/jour. Après une exposition de 8 jours aux deux doses sélectionnées, une augmentation significative de la prolifération des cellules épithéliales intestinales a été observée notamment via l'augmentation de la taille des cryptes et du nombre de cellules positives pour le marqueur de prolifération cellulaire, PCNA (Proliferating Cell Nuclear protein), dans l'iléon, le jéjunum et le duodénum des souris. Une augmentation similaire de la prolifération des cellules épithéliales intestinales a été

décrite dans le jéjunum des souris exposées à une concentration plus élevée (2 mg/kg) (J. Zhou et al., 2019). L'exposition de porcelets au DON pendant 10 jours à une concentration de 0,9 mg/kg d'aliment a entraîné une augmentation de la profondeur des cryptes dans le jéjunum et le duodénum (Alizadeh et al., 2015). De plus, une exposition de porcs pendant 6 semaines à une dose de 12 µg/kg de poids corporel/jour a également montré une augmentation de la profondeur des cryptes dans le jéjunum (Przybylska-Gornowicz et al., 2015). Ces résultats soulignent les risques associés à la consommation de cette toxine, même à des niveaux faibles, dans des conditions d'exposition plus proches de celles de l'Homme.

Nos données relatives aux effets de l'ingestion de DON sur l'intestin grêle ont également révélé des conséquences néfastes. Une intoxication à court terme a entraîné une aggravation de l'entérite induite par l'indométacine, tout comme il a été démontré que l'ingestion de DON prédispose les poulets au développement de lésions grêliques dans un modèle infectieux d'entérite provoqué par *Clostridium perfringens* (Antonissen et al., 2014). De plus, une contamination alimentaire avec une concentration de 8 mg/kg d'aliment de DON pendant 4 semaines a été associée à une augmentation de la gravité des lésions du côlon dans un modèle de colite induite par le DSS (Payros et al., 2020). Des études plus récentes ont révélé qu'une exposition de 28 jours à des doses de 25 et 50 µg/kg de poids corporel/jour de DON aggrave la colite chez les souris C57BL/6, ce qui confirme nos propres résultats (Gan et al., 2023). Dans l'ensemble, ces données indiquent que le DON a le potentiel d'aggraver toute condition inflammatoire préexistante dans l'intestin grêle, indépendamment de son origine. Par conséquent, il est crucial de mener des recherches approfondies sur l'implication du DON dans le développement d'entérites infectieuses et allergiques, d'appendicites, d'ulcères gastriques et de maladies inflammatoires de l'intestin.

En complément des conditions inflammatoires, notre étude met également en évidence que l'exposition au DON peut contribuer à la carcinogenèse *in vivo* dans le modèle du cancer colorectal induit par l'AOM-DSS. Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents, nous avons réalisé une analyse approfondie de la diversité, de la structure et de la fonction du microbiote caecale. Les résultats ont montré une augmentation de la diversité alpha chez les souris exposées au DON par rapport aux témoins, reflétant un nombre relatif accru de taxons bactériens. De plus, les indices de diversité bêta ont révélé des différences significatives dans la composition microbienne entre les trois groupes de souris, principalement attribuables à un petit sous-groupe de taxons bactériens. Une observation notable était l'augmentation de l'abondance relative de l'ordre des *Campylobacterales*, qui

comprend la famille des *Helicobacteraceae*, dans les deux groupes exposés au DON. Il convient de noter que notre analyse n'a pas révélé de variation significative de la souche spécifique *Helicobacter hepaticus*, qui a été précédemment associée à la tumorigenèse du côlon initiée par l'AOM (Nagamine et al., 2008).

Les résultats de l'analyse de corrélation de Spearman montrent de fortes corrélations entre les bactéries modifiées et les variables caractérisant le cancer colorectal, ce qui renforce l'idée d'un rôle important du microbiote intestinal dans les effets protumorigènes du DON. La surabondance des groupes *Eubacterium ruminantium*, *Coriobacteriaceae UCG-002*, *Papillibacter* et *Fournierella*, ainsi que la sous-abondance d'*Anaeroplasma* et *Dubosiella*, pourraient contribuer à l'exacerbation du cancer colorectal induite par le DON. En particulier, nos résultats montrant des corrélations négatives entre la plupart des variables mesurées et l'abondance de *Dubosiella* suggèrent que le défaut de cette souche pourrait être un mécanisme important contribuant à l'effet aggravant du DON dans le modèle AOM-DSS.

L'analyse utilisant PICRUSt2 a révélé une perturbation de plusieurs voies génétiques microbiennes chez les souris exposées au DON, notamment celles impliquées dans la dégradation du fucose. Ces résultats concordent avec une étude antérieure qui a montré une tendance à la diminution de l'abondance relative de la fraction de fucose dans les profils d'oligosaccharides des mucines du duodénum chez les poulets exposés à un régime contaminé par le DON (Antonissen et al., 2015).

Le fucose est un composant abondant des glycanes présents dans le tractus gastro-intestinal des mammifères, décorant les protéines et les lipides, en particulier à la surface des cellules épithéliales exposées à la lumière intestinale et dans les sécrétions muqueuses (Pickard & Chervovsky, 2015). Les protéines fucosylées sont libérées dans la lumière intestinale où le fucose est métabolisé par diverses communautés microbiennes intestinales (Bocci & Winzler, 1969). De nombreuses espèces bactériennes symbiotiques de l'intestin sont capables d'utiliser le fucose, qui a été démontré pour avoir un effet protecteur dans plusieurs modèles pathologiques, notamment sur les bactéries commensales lors d'infections par des pathogènes intestinaux (Garber et al., 2021a; Pickard et al., 2014). Des études ont montré que l'administration exogène de fucose peut inhiber le développement de la colite chronique chez les souris (Ke et al., 2020), et que le L-rhamnose et le L-fucose peuvent supprimer la croissance du cancer chez les souris (Tomsik et al., 2011). De plus, une déficience en fucosylation chez les souris a été associée à l'apparition d'une colite et d'un adénocarcinome (Y. Wang et al., 2017). Par conséquent, on peut supposer que la

perturbation du métabolisme du fucose et du rhamnose chez les souris exposées au DON pourrait être un mécanisme favorisant la tumorigenèse colorectale.

Associée à cette perturbation du métabolisme du fucose bactérien, l'exposition au DON a révélé une augmentation de bactéries dites mucophiles, telles que *Ruminococcus* (Glover et al., 2022) et *Desulfovibrionaceae* (Singh et al., 2023). Ces bactéries possèdent un large éventail d'enzymes actives sur les glucides (CAZymes), notamment des glycosides hydrolases (GH) capables de cliver les liaisons glycosidiques présentes sur les mucines, en particulier le fucose via la GH29 et la GH95, contribuant ainsi à la dégradation du mucus. Dans notre étude, cette augmentation des bactéries dégradant les mucines a été associée à une diminution de la surface du mucus observée sur des coupes histologiques colorées au bleu alcian, sans présenter de variation de l'expression génique de MUC2 (données non publiées dans l'article). De plus, sachant que les souris déficientes pour le gène MUC2 (MUC2^{-/-}) développent spontanément une colite (Van Der Sluis et al., 2006) et des tumeurs au niveau du colon (Velcich et al., 2002), cela renforce l'hypothèse selon laquelle la dégradation potentielle du mucus par des bactéries du microbiote à la suite d'une ingestion de DON pourrait contribuer à l'aggravation des lésions inflammatoires et tumorales dans notre modèle de colite associée au cancer.

De plus, les produits issus de la dégradation du mucus favoriseraient une alimentation croisée (cross-feeding) entre les différentes bactéries du microbiote (Berkhout et al., 2021), entraînant ainsi la prolifération de certaines espèces opportunistes. C'est ce qui semble se produire chez les souris exposées au DON, où l'on observe une augmentation du fucose au niveau luminal associée à une augmentation de certaines bactéries capables d'utiliser ce monosaccharide. C'est notamment le cas des bactéries *Acetatifactor* (Pfeiffer et al., 2012) et d'*Helicobacter* (Garber et al., 2021b), qui utilisent le fucose comme site d'adhésion et de prolifération (T.-W. Liu et al., 2009). Ces deux bactéries ont été décrites comme aggravant les lésions inflammatoires dans un modèle de colite au DSS pour *Acetatifactor* (C. Lee et al., 2019) et les lésions tumorales dans un modèle murin de cancer colorectal pour *Helicobacter* (Ralser et al., 2022). Ces données suggèrent que l'aggravation du cancer colorectal par le DON pourrait être médiée par une dégradation du mucus associée à une prolifération anormale de certaines espèces bactériennes.

D'autres mécanismes potentiels peuvent également contribuer à l'effet protumorigène du DON, notamment une augmentation du potentiel cancérigène des génotoxines présentes dans l'alimentation ou dans le microbiote. Par exemple, dans la lignée cellulaire épithéliale

intestinale non transformée IEC-6, le DON lui-même n'est pas génotoxique, mais il aggrave les dommages à l'ADN provoqués par une large gamme d'agents génotoxiques tels que l'étoposide, le cisplatine et la phléomycine (Garofalo et al., 2022). De plus, une contamination alimentaire par le DON a été associée à une augmentation des dommages à l'ADN intestinal chez les rats colonisés par *E. coli* produisant de la colibactine, un peptide polykétide capable d'alkyler l'ADN (Payros et al., 2017). Ces observations suggèrent que le DON peut potentialiser les effets génotoxiques d'autres substances présentes dans l'alimentation ou dans le microbiote, contribuant ainsi à la genèse du cancer.

Il est important de noter que, malgré l'existence d'autres études révélant les effets d'hyperprolifération suite à une stimulation par le DON, cette mycotoxine reste classée dans le groupe 3 des composés cancérigènes selon la classification établie par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC). Cette catégorie regroupe essentiellement les agents d'exposition pour lesquels les indications de cancérigénicité sont insuffisantes chez l'Homme et limitées chez l'animal de laboratoire (International Agency for Research on Cancer, 1993).

2. Analyse et discussion de l'impact des microplastiques de polyéthylène sur l'intestin et le foie

Il est important de souligner que le DON est un contaminant chimique alimentaire connu depuis longtemps, et qu'il fait partie des contaminants pour lesquels une réglementation sur leur présence dans les denrées alimentaires principales existe déjà. En revanche, la situation diffère pour les contaminants alimentaires émergents tels que les matières plastiques, dont la toxicité pour l'Homme reste à déterminer, et leur impact sur la santé humaine n'est pas pleinement établi. Ces matières plastiques se retrouvent dans notre alimentation sous différentes formes et tailles, appelées micro et nanoplastiques, et elles sont constituées de différents polymères.

Le polyéthylène est le deuxième polymère le plus couramment utilisé commercialement. Il est présent dans diverses industries, notamment celles des films agricoles, des matériaux composites et des emballages (El-Sherif et al., 2022). Le PE est le polymère prédominant dans les produits de soins personnels ainsi que dans les échantillons marins (Akanyange et al., 2022), et il est l'un des polymères de microplastiques les plus fréquemment détectés dans les aliments, l'eau et les boissons (Vitali et al., 2022).

L'objectif de nos études était d'évaluer si la présence de microplastiques de PE dans la lumière intestinale peut induire des perturbations chez l'hôte au niveau intestinal et hépatique. Nous avons étudié les effets de l'exposition orale à deux tailles moyennes différentes de PE (36 μm = RB (red bead) et 116 μm = GB (green bead)). Ces tailles ont été choisies car elles reproduisent ce qui a été détecté dans les selles humaines (N. Zhang et al., 2021). La dose de PE choisie était de 16 mg/kg de poids corporel/jour, reflétant ainsi une dose réaliste d'ingestion humaine de microplastiques (Dourson et al., 2022; Senathirajah et al., 2021). Nous avons également testé l'exposition individuelle ou en mélange des tailles de microplastiques afin de tenir compte de la possibilité d'effets additifs, inhibiteurs ou synergiques.

Des preuves de plus en plus nombreuses indiquent que l'exposition alimentaire aux microplastiques de PE altère la libération de mucus ainsi que la réponse inflammatoire de l'intestin, et il a été démontré que cela perturbe également la composition et le métabolisme du microbiote intestinal (B. Li et al., 2020; H. Sun et al., 2021). Cependant, on en sait beaucoup moins sur les effets des microplastiques de PE sur le foie.

D'un point de vue intestinal, l'exposition aux microbilles de PE a principalement provoqué une hypertrophie des cryptes, une caractéristique potentiellement impliquée dans la tumorigenèse intestinale et nécessitant une étude approfondie (Murray et al., 2021). De plus, l'exposition aux RB a réduit l'expression des gènes MUC2 et Villin 1, ainsi que le recrutement des lymphocytes T CD8+ dans l'intestin grêle proximal.

La présence de microbilles de PE de différentes tailles a eu des effets variés sur l'inflammation colique. L'exposition aux microbilles de PE plus grandes (GB) a entraîné une augmentation de la proportion de neutrophiles et une altération de l'expression de plusieurs gènes, tels que Villin 1, Chromogranin A, Lgr5 (Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5), Occludin, F11r (F11 Receptor) et IFN γ , ainsi qu'un changement dans le recrutement des macrophages anti-inflammatoires dans le côlon. Ces résultats sont cohérents avec une étude antérieure de Li et al., qui a montré une régulation à la hausse des protéines TLR4 (Toll Like Receptor 4), AP-1 (Activator protein 1) et IRF-5 (Interferon regulatory factor 5) dans le côlon suite à une exposition similaire à des microbilles de PE de taille différente (10 à 150 μm , 200 $\mu\text{g/g}$ d'alimentation et exposition de 5 semaines), suggérant un état pro-inflammatoire (B. Li et al., 2020).

En revanche, une étude de Sun et al. a montré que l'exposition à de plus petites microbilles de PE (1 à 10 μm) à une dose de 0,2 $\mu\text{g/g}$ de poids corporel par jour entraînait une

diminution de l'expression d'IL1 β et une augmentation de l'expression d'IL8 et d'IL10, suggérant un effet immunosuppresseur de cette taille de PE (H. Sun et al., 2021). Ainsi, les effets des microbilles de PE ingérées sur l'inflammation colique semblent dépendre de leur taille, avec des effets radicalement différents observés entre les microbilles plus grandes et les plus petites.

De plus, l'absorption des microbilles de PS par la lignée cellulaire épithéliale intestinale humaine Caco-2 a été constatée plus importante pour les particules de 4 μ m que pour celles de 1 μ m (Stock et al., 2019), ce qui suggère que même de légères différences de taille des particules au moment de l'ingestion peuvent influencer la toxicité intestinale. Les effets des microbilles de PE sur le microbiote semblent également dépendre de leur taille, avec des variations observées dans l'abondance des phyla *Firmicutes* et *Bacteroides* en fonction de la taille des microbilles (B. Li et al., 2020; Lu et al., 2018; H. Sun et al., 2021).

Les deux tailles de microbilles de PE ont provoqué des variations similaires dans l'abondance bactérienne au niveau de l'ordre chez les souris exposées. On a observé une diminution de l'abondance des *Verrucomicrobiales* et une augmentation de l'abondance des *Gastranaerophilales*. Bien que l'augmentation des *Verrucomicrobiales* ait été associée au développement d'une colite aiguë dans un modèle expérimental utilisant du DSS (M.-Y. Jin et al., 2021; R. Li et al., 2020), le rôle exact de ces ordres bactériens dans l'inflammation colique n'est pas clairement établi. De plus, les *Gastranaerophilales* montrent des tendances opposées dans différents modèles de colite, ce qui remet en question leur rôle essentiel dans l'inflammation colique (Dou et al., 2020; Shang et al., 2017).

Le mélange des deux tailles de microbilles de PE a entraîné des changements importants. Dans le côlon, nous avons observé une augmentation de la surface de la muqueuse et du mucus, ainsi qu'une régulation à la hausse des gènes MUC2, Villin 1 et Chromogranin A, reflétant une perturbation de la différenciation de la muqueuse colique. L'expression d'Occludin et F11r était également augmentée, suggérant un potentiel dysfonctionnement de la barrière intestinale. Le mélange a également favorisé un état pro-inflammatoire avec une augmentation de l'expression d'IL6 et IFN γ , et des altérations marquées de la réponse immunitaire intestinale, impliquant différentes populations de cellules. De plus, l'exposition au mélange de microbilles de PE a été associée à une réduction de l'abondance de bactéries protectrices du genre *Lactobacillales* (Bartley et al., 2018). En outre, ce mélange a entraîné une augmentation de la fréquence des *Rhodospirillales*, un ordre bactérien lié à plusieurs affections pathologiques telles que le syndrome de chaleur humide (Damp-Heat

syndrome) (Jiang et al., 2020), les symptômes neuropsychiatriques de la maladie d'Alzheimer (Y. Zhou et al., 2021) et l'intoxication animale aux N-nitrosamines (J. Wang et al., 2019).

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que l'exposition au mélange des deux tailles de microbilles de PE a des effets plus sévères sur l'homéostasie des tissus intestinaux que lorsqu'elles sont exposées individuellement. Une étude réalisée par Liang et al. chez des souris a également démontré qu'une exposition à un mélange de particules de PS de 50 et 500 nm entraînait un dysfonctionnement plus prononcé de la barrière intestinale par rapport à une exposition à chaque particule de PS individuellement (Liang et al., 2021). De plus, les chercheurs ont démontré que la co-exposition à différentes tailles de particules de PS modulait leur répartition dans les organes des souris et augmentait leur biodisponibilité. L'hypothèse que nous pouvons avancer est que de manière similaire au PS, l'aggravation des effets observée dans le groupe exposé aux deux tailles de microplastique pourrait être partiellement attribuable à la bioaccumulation des microbilles de PE lors d'une co-exposition. À noter que dans cette dernière étude, l'exposition aux particules de PS de 50 nm augmentait la sécrétion de mucus dans le duodénum, le jéjunum et l'iléon, tandis qu'elle diminuait dans le côlon. Cette diminution de la sécrétion de mucus dans le côlon a également été confirmée chez des souris exposées à des microbilles de PS de 0,5, 5 et 50 μm (Y. Jin et al., 2019; Lu et al., 2018). Dans notre étude, nous avons observé une diminution de la sécrétion de mucus dans l'intestin grêle proximal et une augmentation dans le côlon suite à une co-exposition aux microbilles de PE de 36 et 116 μm .

D'un point de vue hépatique, les résultats ont révélé une augmentation de l'expression transcriptionnelle de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras suite à l'ingestion de PE. En particulier, l'expression d'Acaca était élevée chez les souris exposées à la fois aux RB et aux GB de PE, que ce soit individuellement ou en combinaison. Ce gène joue un rôle crucial dans la catalyse de l'étape limitante de la néoglucogenèse et régule la β -oxydation des acides gras dans l'hépatocyte (Bates et al., 2020). En plus de son rôle dans l'accumulation de lipides dans le foie, Acaca favorise également l'activation des cellules étoilées hépatiques (HSC), contribuant ainsi à la fibrose, ce qui est cohérent avec nos résultats concernant les HSC et la fibrose. Par ailleurs, l'ingestion de PE a également entraîné une augmentation des niveaux de cholestérol et de triglycérides.

Le métabolisme lipidique hépatique en réponse à l'ingestion de microplastiques de PS a déjà été étudié. Contrairement au PE, l'ingestion de microplastiques de PS dans l'eau

potable (à des concentrations de 100 et 1000 µg/l pendant 5 semaines) a entraîné une diminution de l'expression des ARNm de Cd36 et Pparg, conduisant à une réduction de l'accumulation de triglycérides et de cholestérol total dans le foie (Lu et al., 2018). Des microplastiques de PS vieillissants ont également été associés à une diminution relative de l'expression des ARNm de Srebp1c (sterol regulatory element binding protein 1c), Fasn (Fatty Acid Synthase) et Scd1 (stearoyl-CoA desaturase 1) dans le foie, entraînant une diminution de l'accumulation lipidique hépatique de manière similaire aux microplastiques de PS (X. Yang et al., 2022). À noter que ces résultats ont été observés uniquement chez les souris femelles, suggérant que les effets des microplastiques de PS sur le métabolisme lipidique hépatique dépendent du sexe. De plus, une exposition maternelle aux microplastiques de PS dans l'eau potable pendant la gestation a entraîné une diminution des taux de cholestérol total dans le foie des descendants mâles et femelles, associée à une régulation à la baisse de nombreux gènes impliqués dans l'absorption des acides gras, la β -oxydation et la synthèse (T. Luo et al., 2019). De manière similaire, l'ingestion de PVC (à une dose de 0,5 mg/jour pendant 60 jours) a induit une diminution des taux hépatiques de triglycérides (Chen et al., 2022a). Ainsi, les effets du PE semblent être opposés à ceux du PS et du PVC, car nos données suggèrent une accumulation lipidique hépatique due au PE.

De plus, l'ingestion de PE a entraîné une augmentation significative de l'expression des enzymes de métabolisation des xénobiotiques. Par exemple, l'expression de CYP2A4 a été régulée à la hausse par les RB et les GB, que ce soit individuellement ou en combinaison, après 6 et 9 semaines d'exposition. Il est important de noter que l'expression de CYP2A4 est fortement prédominante chez les femelles (ratio femelles/mâles d'environ 1000) et que cette enzyme catalyse l'hydroxylation de la testostérone (Nail et al., 2021). CYP2A4 présente une large spécificité de substrat, incluant les hormones stéroïdiennes, les lipides et d'autres xénobiotiques tels que le cadmium (H. Wang et al., 2022). D'autres mécanismes de défense du foie ont également été modulés suite à l'ingestion de PE, notamment les gènes codant pour l'enzyme Nitric Oxide Synthase 2 (NOS2), la catalase ainsi que Nfe2l2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2), Nqo1 (NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1) et Hmox1. L'ingestion de PE a eu un impact sur la régulation des gènes impliqués dans le stress oxydant, ce qui est cohérent avec d'autres études montrant des lésions oxydatives du foie suite à l'ingestion de microplastiques de PS (S. Li et al., 2021; Mu et al., 2022), de nanosphères de PS (Yasin et al., 2022) et de microplastiques de PVC (Chen et al., 2022a).

D'après nos résultats, l'ingestion de PE entraîne une inflammation hépatique de faible intensité, se manifestant par une augmentation des foyers inflammatoires et une régulation à la hausse des cytokines inflammatoires. Des effets similaires ont été observés suite à l'exposition aux microplastiques de PS (500 et 1000 mg/l) avec une sécrétion accrue d'IL-1 β dans le foie (Mu et al., 2022), ainsi qu'aux microplastiques de PS (0,5 mg/souris) qui ont augmenté l'infiltration de cellules NK et de macrophages dans les cellules hépatiques non parenchymateuses, perturbant l'expression de plusieurs cytokines (Zhao et al., 2021).

Associé aux perturbations métaboliques et inflammatoires, l'ingestion de microplastiques de PE a induit une hyperprolifération des cellules du foie, ce qui peut potentiellement favoriser le développement de l'hépatocarcinogenèse. Selon l'expression des différents marqueurs cellulaires du foie, nos données suggèrent que les HSC pourraient être la cible de l'hyperprolifération, ce qui nous a incité à étudier les effets de l'ingestion de PE sur la susceptibilité à la fibrose hépatique. L'exposition au PE a été liée à une augmentation de la fibrogenèse induite par le CCl₄, caractérisée par une augmentation notable du dépôt de collagène, d' α -SMA (Alpha smooth muscle actin) et de plusieurs marqueurs fibrotiques dans le foie.

Dans une étude menée par Shen et al., il a été démontré que l'administration de microplastiques de PS à des concentrations de 0,1 ou 1 mg/l dans l'eau potable pendant 60 jours était suffisante pour induire le développement de la fibrose hépatique chez les souris. Cependant, lors d'une contamination alimentaire chronique par le PE dans des conditions saines, aucune fibrose hépatique n'a été observée, tandis que dans des conditions profibrosantes, une aggravation de la fibrogenèse a été constatée. Ces différences dans les résultats pourraient être dues à des différences de conception expérimentale ou de composition chimique entre les polymères. D'autres études ont également montré que l'exposition à différents polymères de microplastiques pouvait aggraver des préconditions, comme l'exposition au PS qui a exacerbé les lésions hépatiques induites par le cyclophosphamide et l'acétaminophène (J. Liu et al., 2022; Wen et al., 2022). De plus, les nanoparticules de PS ont favorisé le développement de la fibrose hépatique chez les souris nourries avec un régime riche en graisses (L. Li et al., 2022). Ces résultats soulèvent des inquiétudes quant à la possibilité que l'exposition aux microplastiques puisse aggraver les pathologies hépatiques préexistantes chez les individus sensibles.

Conformément à nos résultats au niveau intestinal, les effets néfastes du PE se manifestent principalement lors d'une exposition aux GB ou à la co-exposition aux RB et aux GB, plutôt

que lors d'une exposition aux RB individuelle. Cette disparité pourrait être attribuée à la fragmentation des microplastiques que nous avons pu mettre en évidence dans les selles des souris. Cette fragmentation pourrait avoir lieu pendant le processus gastro-intestinal, mais aussi lors de la mastication des aliments qui favoriserait notamment la fragmentation des grandes microbilles pouvant générer des fragments de plus petites tailles voire des nanoplastiques le tout sous un aspect polymorphiques, mais cela nécessite des études plus approfondies, par exemple, par l'analyse de la structure des fragments à l'aide de la spectroscopie RAMAN ou de l'analyse par FTIR (infrarouge à transformée de Fourier) à différents niveaux du tractus intestinal, y compris au niveau de l'estomac.

À ce jour, aucune étude n'a évalué la fragmentation des microplastiques dans le tractus gastro-intestinal chez les mammifères. Cependant, Tamargo et al. ont montré que les microplastiques de PET semblaient présenter une amorphisation de leur structure suite à un contact avec la flore intestinale humaine, mettant également en évidence la formation d'un biofilm bactérien (Tamargo et al., 2022). Les travaux de Fournier et al., démontrant l'impact des microplastiques de PE sur l'écosystème digestif humain *in vitro* dans des conditions réalistes, n'ont pas révélé de changement morphologique des microbilles, mais ont aussi mis en évidence la formation d'un biofilm bactérien, suggérant que les bactéries du microbiote intestinal ont la capacité d'adhérer et éventuellement de dégrader les particules de plastique (Fournier, Leveque, et al., 2022). D'autres études montrent la capacité de certaines espèces non mammifères à dégrader les microplastiques dans leur tube digestif, comme c'est le cas chez certains crustacés (Krill antarctique) qui peuvent dégrader les microplastiques en nanoplastiques dans leur tube digestif (Dawson et al., 2018), ou encore chez le ver de terre (*Lumbricus terrestris*) (Meng et al., 2023). Ces études suggèrent fortement l'implication des bactéries intestinales dans le processus de fragmentation des microplastiques.

De plus, des analyses supplémentaires dans notre étude se révèlent nécessaires pour confirmer l'impact des microplastiques de PE sur la perméabilité intestinale notamment induite par les GB seules ou associées aux RB (via des tests au FITC-dextran (isothiocyanate de fluorescéine). Cela permettrait de confirmer les observations faites sur la potentielle rupture de la barrière intestinale avec la diminution de la sécrétion du mucus au niveau du grêle proximal et la modulation de l'expression des jonctions serrées au niveau du colon. Cette hypothèse pourrait laisser envisager un passage de fragments de microplastiques de PE, là aussi accentué par les éventuels fragments polymorphiques, depuis l'intestin vers le foie, comme l'ont déjà montré Deng et al. avec les microplastiques

de PS de 5 et 20 μm , sans qu'ils n'indiquent s'il s'agit de fragments ou de microplastiques intacts retrouvé au niveau du foie (Y. Deng et al., 2017). L'utilisation de microplastiques fluorescents dans notre étude devrait permettre de répondre à cette question, notamment en mettant en évidence leur présence et en caractérisant leur morphologie au niveau hépatique. Cela pourrait être notamment la cause de l'augmentation de l'expression des enzymes de métabolisation des xénobiotiques observée chez les souris exposées aux microplastiques. Par conséquent, nos données suggèrent qu'une exposition aux microplastiques de différentes tailles, qui reflète davantage les conditions réelles, semble avoir un impact toxique plus prononcé au niveau intestinal et hépatique.

Pour approfondir la pertinence de ces résultats chez l'Homme, des recherches complémentaires sont nécessaires. Récemment, des études ont débuté pour explorer les effets du PS sur des organoïdes hépatiques dérivés de cellules souches pluripotentes humaines (Cheng, Li, et al., 2022; Cheng, Zhou, et al., 2022). Ces organoïdes ont reproduit plusieurs caractéristiques de l'hépatotoxicité observées *in vivo*, notamment une augmentation de l'inflammation et un déséquilibre antioxydant. L'inhibition de la β -oxydation des acides gras, entraînant la stéatose, a également été constamment observée dans les études sur les souris et dans les organoïdes hépatiques humains. De plus, une augmentation du marqueur fibrotique Col1a1 (collagen type I alpha 1 chain) a été détectée dans les organoïdes hépatiques (Cheng, Li, et al., 2022).

3. Limites et perspectives de nos études

Nos études ont apporté des éclairages précieux sur la toxicité des contaminants alimentaires, en se concentrant spécifiquement sur le déoxynivalénol et les microplastiques de polyéthylène. Ces recherches nous ont permis de mieux comprendre les effets de ces substances sur l'intestin et le foie, ainsi que leurs implications potentielles dans des pathologies telles que l'entérite, le cancer colorectal et la fibrose hépatique.

Cependant, il est important de noter que ces études présentent certaines limites et ne reproduisent pas fidèlement les conditions auxquelles l'Homme est exposé. Dans notre quotidien, nous sommes confrontés à de multiples contaminants alimentaires susceptibles d'interagir à la fois entre eux et avec notre microbiote intestinal. Ces interactions complexifient la réalité, dépassant ainsi les conditions expérimentales en laboratoire, lesquelles examinent la plupart du temps ces contaminants de manière individuelle. De plus, nous sommes exposés à ces contaminants à toutes les étapes de notre vie, ce qui souligne

la nécessité de recherches à long terme pour appréhender pleinement leurs devenir dans notre organisme et leurs effets cumulatifs. Par conséquent, il reste encore un vaste champ d'investigation nécessaire pour approfondir notre compréhension de ces mécanismes d'interaction et de leurs implications sur notre santé.

3.1. Dans le cas du déoxynivaléno

3.1.1. Prise en compte des effets cocktail

En ce qui concerne les mycotoxines, plusieurs études ont déjà examiné les effets des mélanges de contaminants dans le but de mieux appréhender les interactions entre eux et leurs implications pour la santé humaine. À titre d'exemple, une étude menée sur diverses lignées cellulaires (Caco2, HEK, HepG2 et RAW 264.7) a révélé des effets antagonistes résultant de la combinaison du DON avec la mycotoxine T-2 (ratio 1:1 à 3.87 nM pendant 72 heures), tandis que la combinaison du DON avec d'autres mycotoxines (HT-2 et diacétoxyscirpenol) a montré des effets additifs, voire synergiques, sur la cytotoxicité cellulaire (V. Tran et al., 2020). De manière similaire, une co-exposition chronique au DON et à la zéaralénone sur des cellules hépatiques (1.6 nM à 2500 nM pour DON et 0,85 à 240 nM pour la zéaralénone pendant 14, 28 42 jours sur HepaRG) a révélé une toxicité à long terme de ce mélange, par rapport aux effets individuels de ces mycotoxines (Smith et al., 2017). Chez le porcelet soumis à un régime de co-contamination au DON et à la fumonisine (130 µg/kg pc/jour de DON avec 260 µg/kg pc/jour de fumonisine pendant 35 jours), différentes interactions ont été observées selon les paramètres évalués, incluant des effets synergiques sur les cellules caliciformes et éosinophiles, ainsi que des effets antagonistes sur l'expression de cytokines (IL1b et IL6) (A.-P. F. L. Bracarense et al., 2012).

Enfin, des études soulignent l'importance d'évaluer la toxicité des contaminants alimentaires de différentes classes (Fu et al., 2022). Par exemple, des recherches ont démontré des effets synergiques entre le DON et le cadmium sur des modèles cellulaires humains (aux doses de 3, 10 et 30 µM pendant 48 heures sur un modèle de Caco2 sur transwell) (S. Luo et al., 2019). De même, la co-exposition de la mycotoxine T-2 et du pesticide propiconazole (0.39 mg/L et 17.16 mg/L pendant 96 heures) a montré des effets considérables sur le stress oxydant, l'apoptose cellulaire et le système nerveux central chez le poisson zèbre (S. Zhang et al., 2023). Ces résultats mettent en évidence les interactions complexes entre les contaminants alimentaires et soulèvent la nécessité de prendre en compte ces combinaisons de contaminants dans les études toxicologiques.

3.1.2. Approfondir la pertinence chez l'Homme

Le DON a suscité un intérêt croissant en raison de sa toxicité avérée dans l'alimentation animale, ce qui a motivé une surveillance mondiale en raison de ses répercussions sur les rendements. Des études expérimentales menées sur des animaux à des niveaux d'exposition réalistes pour l'Homme ont mis en évidence une gamme variée d'effets toxiques, notamment des réactions pro-inflammatoires, des altérations de la barrière intestinale et un stress oxydant. Notre étude actuelle a même montré pour la première fois son potentiel à exacerber l'inflammation intestinale et à favoriser le développement du cancer colorectal. Cependant, malgré ces avancées, certaines incertitudes subsistent quant à la pertinence de ces effets chez l'Homme.

En effet, l'attention portée à cette mycotoxine chez l'Homme dans la littérature est limitée. Comme le soulignent Claeys et al. en 2020, les études épidémiologiques sur les liens entre le DON et les maladies chroniques telles que les MICI et le CCR font défaut (Claeys et al., 2020). Alors que les liens entre l'exposition à cette mycotoxine et les maladies chroniques sont bien établis dans des études expérimentales animales, leur extrapolation aux êtres humains nécessite des recherches avec des méthodologies plus proches de la physiologie humaine, voire des études épidémiologiques, pour élaborer des stratégies de santé publique étayées par des preuves solides.

Par exemple, peu d'études ont exploité des modèles *in vitro* novateurs qui se rapprochent de la physiologie intestinale. Ces modèles pourraient offrir des perspectives différentes de celles obtenues avec les modèles conventionnels. Une étude de Pöschl et al. en 2023 a utilisé un modèle d'organe sur puce reproduisant un tube intestinal cellulaire composé de cellules Caco2. Les auteurs ont montré que l'exposition du DON (3 à 300 μM pendant 24 heures) du côté basal des cellules induisait une mort cellulaire plus prononcée, tandis que la réponse inflammatoire (sécrétion d'IL8) était stimulée uniquement du côté apical (Pöschl et al., 2023). Des résultats similaires ont été observés dans une étude utilisant un modèle d'organoïdes murins, où seule la voie basolatérale stimulée par le DON (1 μM pendant 24 heures) perturbait la barrière intestinale et réduisait le nombre de cellules souches et de cellules proliférantes (Hanyu et al., 2020).

En prenant en compte ces études, ainsi que le manque d'études approfondies concernant les effets pro-inflammatoires et pro-cancérogènes de cette mycotoxine chez l'Homme, il est impératif d'évaluer l'impact du DON sur des modèles d'organoïdes intestinaux humains, en tenant compte de la voie d'exposition. Cette approche permettra d'acquérir une meilleure

compréhension des effets potentiellement délétères de cette mycotoxine alimentaire chez l'Homme.

D'autre part, la considération des métabolites produits suite à l'ingestion et à la détoxification du DON présente un aspect original et prometteur pour dévoiler les différents acteurs sous-jacents à la physiopathologie des MICI, qui demeurent encore insuffisamment explorés. En effet, le DON peut subir une détoxification au sein de l'organisme par le biais de deux voies métaboliques majeures : la dé-époxydation effectuée par les bactéries intestinales, conduisant à la formation du dé-époxy-DON (ou DOM-1), et la glucuronidation par les enzymes endogènes exprimées dans l'épithélium intestinal, à savoir les UDP-glucuronyltransférases (UGT), aboutissant à la création du DON-glucuronide (Maresca & Fantini, 2010; Poppenberger et al., 2003; Springler et al., 2017).

Des altérations dans la composition du microbiote intestinal et les mécanismes de détoxification ont été observées chez les patients atteints de MICI (Langmann & Schmitz, 2006). Ces pathologies sont vraisemblablement le résultat d'interactions complexes entre des facteurs génétiques, le microbiote intestinal et des éléments environnementaux, conduisant à des réponses immunitaires inadéquates. On peut donc émettre l'hypothèse qu'une défaillance dans le processus de détoxification du DON, impliquant le microbiote intestinal ainsi que les enzymes endogènes, pourrait potentiellement accroître la vulnérabilité des patients atteints de MICI face au DON.

3.2. Dans le cas des microplastiques

3.2.1. Prise en compte des différents polymères et de leur capacité à véhiculer des xénobiotiques

Dans le cas des microplastiques, il est important de noter qu'il existe une multitude de polymères différents, dont certains peuvent avoir des effets distincts sur l'organisme. De plus, même si notre étude a démontré que le polyéthylène présente une toxicité intestinale et hépatique à lui seul, dans la réalité, les plastiques ne sont pas simplement constitués de polymères purs ; ils contiennent souvent des additifs qui leur confèrent des propriétés spécifiques. Ces additifs sont utilisés pour diverses raisons, telles que l'amélioration de la résistance aux UV (ultra-violet), la flexibilité, la résistance à la chaleur, la couleur ou la transparence, entre autres. Certains additifs sont également utilisés pour stabiliser les plastiques pendant leur fabrication ou pour améliorer leur durabilité.

Des études ont été menées pour évaluer la présence et la migration de ces additifs dans les plastiques, ainsi que leurs impacts potentiels sur la santé humaine et l'environnement. Certains additifs, tels que les phthalates (Sree et al., 2022) et les retardateurs de flamme bromés (Marques & Cairrao, 2023), ont suscité des inquiétudes en raison de leurs propriétés toxiques potentielles et de leur capacité à être libérés des plastiques et à se retrouver dans l'environnement.

De plus, il est désormais bien établi dans la littérature que les microplastiques présents dans l'environnement et susceptibles de se retrouver dans notre alimentation ont la capacité d'adsorber différents types de contaminants tout au long de leur cycle de vie, les transformant ainsi en vecteurs de composés dangereux (Joo et al., 2021). Par exemple, une étude menée par Sun et al. a montré une forte synergie de bioaccumulation de microplastiques de PS et de l'époxiconazole, un fongicide largement utilisé, chez des souris exposées par voie orale (0.012 et 0.120 mg/kg de poids corporel/jour pour les microplastiques et 0.08 mg/kg de poids corporel/jour pour le pesticide par gavage pendant 6 semaines). Cette toxicité combinée était attribuée à une perturbation de la barrière intestinale par l'époxiconazole, permettant une invasion massive des particules de PS dans différents tissus, notamment le foie, entraînant ainsi de graves perturbations des principales fonctions hépatiques telles que la détoxification et le métabolisme lipidique (W. Sun et al., 2022).

Un autre aspect problématique lié aux microplastiques dans l'environnement réside dans leur capacité à abriter et à transporter divers microorganismes (Qiu et al., 2022). Lorsque ces microorganismes interagissent avec les microplastiques, cela peut entraîner des modifications dans leurs caractéristiques, ainsi que celles des biomolécules telles que le LPS, les allergènes et les antibiotiques. Ces altérations peuvent affecter leur interaction avec le système immunitaire de l'hôte, en particulier avec les cellules immunitaires innées, et très probablement influencer la nature de la réponse innée et inflammatoire ultérieure (W. Yang et al., 2023).

Par conséquent, afin de mieux appréhender les risques associés aux microplastiques présents dans notre alimentation, il est impératif de poursuivre les recherches en prenant en compte cette complexité et en examinant les effets combinés des multiples contaminants auxquels nous sommes exposés. Dans cette perspective, nous conduisons une étude novatrice visant à évaluer l'impact des microplastiques sur l'homéostasie intestinale. Notre projet consiste à exposer des souris à des microplastiques provenant de l'environnement,

représentatifs de l'exposition humaine. Afin que nos résultats soient pertinents par rapport aux conditions d'exposition chez l'Homme, ce mélange de microplastiques sera élaboré et caractérisé de manière détaillée. Cette approche nous permettra d'analyser en profondeur l'impact sur l'homéostasie intestinale et la flore intestinale.

3.2.2. Étayer la pertinence chez l'Homme

Il est important de noter que les microplastiques pourraient émerger en tant que facteurs de risque potentiels pour les MICI, comme le souligne l'étude de Yan et ses collègues. Cette recherche a mis en évidence une corrélation positive entre la présence de microplastiques dans les matières fécales et la sévérité de la pathologie chez les patients atteints de la maladie de Crohn (Yan et al., 2022). De même, ils pourraient jouer un rôle dans les risques de cancer, comme l'indique l'étude menée par Shankar et son équipe. En effet, une exposition professionnelle à la poussière de polyvinylchlorure et au chlorure de vinyle a été associée à une augmentation du risque de cancer du poumon (Shankar et al., 2019). En conséquence, nous entreprendrons également d'évaluer le potentiel des microplastiques à aggraver l'inflammation intestinale et à favoriser le développement du cancer colorectal chez la souris.

Enfin, pour consolider la validité de nos conclusions à l'échelle humaine et pour élucider les mécanismes sous-jacents aux effets intestinaux observés chez les animaux, nous mettrons en œuvre une étude pluridisciplinaire impliquant des sujets humains. Cette étude se focalisera particulièrement sur la comparaison entre des individus en bonne santé, des personnes atteintes de MICI, avec une distinction entre la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, et des individus souffrant de cancer colorectal. L'objectif principal de cette étude sera d'identifier, de quantifier et de caractériser les micro- et nanoplastiques dans les échantillons fécaux, tout en établissant des corrélations entre les cocktails identifiés, la composition du microbiote intestinal et la sévérité des pathologies étudiées. Ainsi, nous pourrons mettre en évidence des cocktails de micro et nanoplastiques associés à des environnements dysbiotiques, pro-inflammatoires et/ou pro-carcinogènes chez l'Homme. Par la suite, ils seront examinés plus en détail sur des modèles de microbiote humain et des modèles d'organoïdes intestinaux.

3.2.3. De l'exposition précoce aux impacts à l'âge adulte : perspectives à considérer

Depuis les premiers stades de la vie, y compris pendant la période *in utero*, nous sommes continuellement exposés à des contaminants alimentaires, une réalité qui a émergé comme un élément potentiellement crucial dans le contexte du développement et de la progression des pathologies intestinales. Ces expositions alimentaires ont également des implications profondes pour le concept des origines développementales de la santé et des maladies (DOHaD) (Heindel et al., 2017). Les maladies intestinales, notamment les MICI et le cancer colorectal, ont démontré des liens complexes avec des expositions alimentaires contenant diverses substances, parmi lesquelles les résidus de pesticides, les produits chimiques industriels et les additifs alimentaires.

Le concept du DOHaD suggère que les expositions environnementales, y compris celles qui se produisent pendant les périodes critiques du développement fœtal et infantile, peuvent influencer de manière durable la susceptibilité à certaines maladies à l'âge adulte (Simeoni et al., 2016). Dans le contexte des pathologies intestinales, cela soulève la possibilité que les expositions aux contaminants alimentaires, même à des stades précoces de la vie, puissent perturber le développement normal du système immunitaire et du microbiote intestinal, conduisant potentiellement à des altérations durables de la santé intestinale.

Dans ce contexte, nos futures recherches viseront à comprendre comment les expositions précoces aux contaminants alimentaires, tels que les microplastiques, pourraient interagir avec les processus de développement intestinal et les facteurs environnementaux pour influencer la susceptibilité aux pathologies intestinales à l'âge adulte. Nous mettrons en place des études chez la souris, en exposant des mères gestantes à des microplastiques pendant la période périnatale, afin de déterminer comment ces expositions pourraient potentiellement influencer le développement du système immunitaire, la composition du microbiote intestinal et la susceptibilité aux pathologies intestinales tout au long de leur vie. En examinant les mécanismes sous-jacents à l'interaction entre les expositions environnementales précoces et le développement intestinal, nous pourrions obtenir des informations cruciales pour la prévention et la gestion des pathologies intestinales à l'âge adulte.

3.2.4. Impact au-delà de la sphère digestive : exploration de l'axe intestin-microbiote-cerveau

Au sein de l'organisme, la communication entre les différents organes joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie et de la fonction physiologique globale. L'intestin, en particulier, est au cœur de ce réseau complexe de communication bidirectionnelle. Connu depuis longtemps comme l'organe principal de la digestion et de l'absorption des nutriments, l'intestin est également reconnu comme un organe endocrinien majeur, sécrétant une gamme variée de peptides et de molécules bioactives, tels que les hormones intestinales et les cytokines (Mayer et al., 2022). Ces signaux biochimiques sont essentiels pour réguler divers processus métaboliques et immunitaires, non seulement dans l'intestin lui-même, mais aussi dans d'autres organes distants, tels que le foie, le cerveau, le pancréas et les muscles.

Un exemple majeur de l'interaction entre l'intestin et d'autres organes est l'axe intestin-cerveau. Le microbiote intestinal, composé de milliards de micro-organismes, a été identifié comme un acteur clé dans la régulation de la communication intestin-cerveau, influençant des fonctions telles que le comportement, l'humeur et la cognition. Les mécanismes de cette communication impliquent la production de métabolites intestinaux, tels que les neurotransmetteurs et les métabolites à chaîne courte, qui peuvent traverser la barrière intestinale et influencer le système nerveux central (Ahlawat et al., 2021).

Les pathologies neurologiques, notamment le trouble du spectre de l'autisme (TSA) et les troubles neurodégénératifs, ont été associées à des altérations du microbiote intestinal (Morais et al., 2021). Le TSA, englobant divers troubles du développement neurologique, se caractérise par une gamme variée de symptômes, incluant des manifestations comportementales et gastro-intestinales. Des disparités dans la composition du microbiote intestinal ont été observées entre les individus atteints de TSA et les individus neurotypiques. Les modèles animaux ont révélé que les bactéries intestinales jouent un rôle dans les comportements centraux liés au TSA. Par ailleurs, des traitements tels que la transplantation de microbiote fécal ont montré des améliorations comportementales chez les patients TSA (Kang et al., 2019). De façon similaire, des études récentes ont évoqué un lien entre le microbiote intestinal et la maladie de Parkinson (MP). La composition de la communauté microbienne ainsi que le profil métabolique dans le sérum des individus atteints de MP diffèrent de ceux des individus en bonne santé. Ces distinctions incluent une

augmentation des niveaux d'*Enterobacteriaceae* et une diminution des micro-organismes intestinaux associés à des propriétés anti-inflammatoires (Barichella et al., 2018).

Certaines études ont examiné les effets de l'ingestion de microplastiques sur le système nerveux central des souris, montrant notamment qu'ils peuvent influencer les comportements liés au TSA. Dans une étude récente, une corrélation potentielle entre l'exposition aux microplastiques de PE (forme sphérique, d'une taille comprise entre 10 et 20 μm , à une concentration de 100 ppm par gavage pendant 2 semaines au cours de la gestation), les comportements associés au TSA et les déséquilibres du microbiote a été explorée. Les résultats ont révélé que l'exposition au PE induisait des comportements similaires aux traits du TSA chez les souris, notamment une diminution de l'interaction sociale, de la nouveauté sociale et de la mémoire spatiale de travail, ainsi qu'une augmentation des comportements répétitifs et compulsifs. Cette similitude a été observée à différents stades de développement des souris, tels que le post-sevrage, la puberté et l'âge adulte, après une exposition orale au PE à des doses de 100 ppm/100 μL . Ces constatations suggèrent une possible association entre l'exposition aux microplastiques, les perturbations du microbiote et les comportements associés au TSA, mais des investigations complémentaires sont nécessaires pour approfondir cette compréhension (Zaheer et al., 2022).

4. Microplastiques et mycotoxines : Parallèles dans leurs impacts sur la santé, rôle vecteur et co-exposition alimentaire

À ce jour, la littérature scientifique n'a pas encore fourni de données établissant clairement un lien potentiel entre les microplastiques et les mycotoxines, ni n'a évoqué de manière concluante une possible co-exposition entre ces deux types de contaminants alimentaires. Les études existantes se sont principalement concentrées sur les effets indépendants de chaque contaminant, évaluant leurs impacts respectifs sur la santé humaine. L'absence d'informations substantielles sur une interaction ou une synergie entre les microplastiques et les mycotoxines souligne le besoin pressant de recherches approfondies visant à explorer ces possibles interconnexions.

Au cours de nos différentes études, des analogies notables ont été constatées entre les effets induits par le déoxynivalénol et ceux engendrés par les microplastiques de polyéthylène. Ces similarités englobent plusieurs aspects, comprenant la rupture de l'intégrité de la barrière intestinale, caractérisée par des modifications telles que la

modulation de la sécrétion du mucus et l'altération de l'expression des jonctions serrées. De plus, ces deux contaminants alimentaires ont induit une augmentation marquée de la prolifération cellulaire au niveau des cryptes intestinales, associée à une perturbation de la différenciation cellulaire, notamment avec l'augmentation de l'expression génique de Villin1, marqueur de différenciation entérocytaire. Ces deux contaminants induisent aussi un environnement inflammatoire en favorisant l'induction de cytokines et de chimiokines, notamment l'IFN-gamma, tout en présentant un défaut dans le recrutement des cellules immunitaires (cellules dendritiques pour le DON et macrophages anti-inflammatoires pour les microplastiques de PE). Associées à ces perturbations induites au niveau de la muqueuse intestinale, ces deux contaminants impactent aussi le microbiote intestinal en diminuant certaines espèces bénéfiques pour l'hôte, telles que les lactobacilles pour les microplastiques de PE et les bifidobactéries pour le DON.

Un effet potentialisateur par ces deux contaminants pourrait résulter de l'effet vecteur des microplastiques. En effet, leur fort pouvoir adsorbant et leur grande surface offre des sites d'adsorption attrayants pour des composés chimiques variés, allant des polluants organiques persistants aux métaux lourds (Amelia et al., 2021). Cette propriété d'adsorption peut entraîner la concentration de substances toxiques sur la surface des microplastiques et généralement avec une plus grande affinité pour les substances hydrophobes comme les mycotoxines, y compris le DON, mais pour l'heure aucune étude n'a mis en évidence de mycotoxine sur les microplastiques.

De plus, les microorganismes présents dans les environnements aquatiques et terrestres ont la capacité d'adhérer et de proliférer à la surface des microplastiques. Les biofilms formés par ces microorganismes peuvent modifier la composition chimique des microplastiques et potentiellement influencer la libération de substances adsorbées (Qiu et al., 2022). Au niveau terrestre, il a été démontré que plusieurs espèces de champignons, dont les *Fusarium*, étaient capables de coloniser et de proliférer à la surface des microplastiques (taille comprise entre 3 et 5 mm sans distinction du type de polymère), suggérant une potentielle contamination par des métabolites secondaires comme les mycotoxines (Gkoutselis et al., 2021). Ainsi, les microplastiques ne se limitent pas à être de simples particules inertes ; ce sont plutôt des entités dynamiques qui interagissent activement avec leur environnement en tant que vecteur de composés, y compris des microorganismes et potentiellement leurs métabolites tels que des mycotoxines. Une exploration plus approfondie de cette thématique reste encore à être étudiée.

Conclusion générale

La sécurité sanitaire des aliments est une préoccupation de premier ordre en matière de santé publique, comme le souligne l'Organisation mondiale de la santé (OMS). L'incidence des aliments insalubres crée un cercle vicieux de maladies et de malnutrition, touchant tout particulièrement les nourrissons, les jeunes enfants, les personnes âgées et les individus souffrant déjà de problèmes de santé. Chaque année, l'OMS évalue à environ 600 millions de personnes dans le monde, soit près d'une sur 10, tombent malades après avoir consommé des aliments contaminés, entraînant la mort de 420 000 personnes et une perte de 33 millions d'années de vie en bonne santé. Les conséquences économiques sont également importantes, avec un manque à gagner estimé à environ 110 milliards de dollars par an pour les pays à revenu faible et intermédiaire, en raison des pertes de productivité et des dépenses de santé qui en découlent. De plus, les enfants de moins de 5 ans supportent une charge importante de morbidité liée aux maladies d'origine alimentaire, entraînant le décès de 125 000 d'entre eux chaque année. Ces maladies entravent le développement socio-économique en exerçant une pression considérable sur les systèmes de soins de santé et en affectant les économies nationales, le tourisme et le commerce.

Pour faire face à ces enjeux majeurs de sécurité sanitaire des aliments, il est impératif de renforcer la surveillance alimentaire à l'échelle mondiale. Cela implique la mise en place de systèmes de suivi et de contrôle efficaces pour détecter rapidement les éventuelles contaminations et agir de manière préventive. De plus, il est essentiel de mener des analyses approfondies sur la toxicité des contaminants chimiques alimentaires, en particulier ceux émergents, dont les effets sur la santé humaine peuvent être encore méconnus.

Ces travaux de thèse contribuent activement à l'effort de cette surveillance alimentaire en abordant deux aspects importants. D'une part, ils examinent l'impact toxicologique de la mycotoxine DON sur des sujets vulnérables, en respectant les doses déjà réglementées. D'autre part, ils mettent en lumière les effets néfastes des contaminants émergents tels que les microplastiques de polyéthylène, pour lesquels aucune réglementation n'existe actuellement quant à leur présence dans les denrées alimentaires.

Ainsi, nos données montrent que la mycotoxine DON induit une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales dans le duodénum, le jéjunum, l'iléon et le côlon chez les souris exposées pendant 8 jours à une dose équivalente à l'exposition alimentaire humaine. De plus, cette exposition au DON entraîne une aggravation de l'intensité de l'entérite induite par l'indométacine et favorise le développement du cancer colorectal dans

un modèle murin. Ces effets pro-tumorigéniques du DON sont associés à des altérations de la diversité, de la composition et du métabolisme du fucose et du rhamnose dans le microbiote intestinal.

Ces résultats approfondissent notre compréhension des effets néfastes du DON sur l'intestin et mettent en évidence la nécessité de prêter une attention particulière aux individus présentant une susceptibilité intestinale. Des études supplémentaires sont indispensables pour mieux caractériser les effets de l'ingestion de DON sur le développement du cancer colorectal et évaluer leur pertinence chez l'Homme.

Dans le cas des microplastiques de PE, cette étude a démontré qu'une exposition orale de 6 semaines de souris induit des perturbations histologiques, inflammatoires et immunitaires de l'intestin grêle jusqu'au côlon. Cette exposition entraîne également des défauts liés à la différenciation intestinale, à la fonction barrière et à la réponse immunitaire lorsque deux tailles de microbilles de PE sont combinées. Ces altérations de la réponse intestinale pourraient contribuer à long terme à l'apparition de maladies inflammatoires à médiation immunitaire. En ce qui concerne le foie, cette étude met en évidence que l'exposition alimentaire au PE altère les mécanismes de défense et favorise l'accumulation de lipides, l'inflammation de bas grade et la prolifération cellulaire. De plus, cette exposition aggrave la fibrogenèse dans un modèle de fibrose hépatique induite par le CCl₄.

Ces résultats indiquent que l'exposition au PE peut entraîner des effets indésirables au niveau intestinal et hépatique. La contamination omniprésente par les microplastiques soulève donc des préoccupations quant à son potentiel à contribuer à l'aggravation des pathologies intestinales et hépatiques chroniques, mettant en évidence la nécessité de mieux comprendre les risques associés à ces contaminants dans notre alimentation.

En conclusion, ces études mettent en évidence les risques potentiels pour la santé publique associés à ces contaminants alimentaires et soulignent la nécessité de renforcer la surveillance et la compréhension de leur impact sur notre organisme. Ces avancées scientifiques sont essentielles pour assurer la sécurité sanitaire des aliments et préserver la santé des populations face aux défis croissants liés à la contamination alimentaire.

Annexes



Chronic ingestion of deoxynivalenol at human dietary levels impairs intestinal homeostasis and gut microbiota in mice

Cécile Vignal¹ · Madjid Djouina¹ · Muriel Pichavant² · Ségolène Caboche² · Christophe Waxin¹ · Delphine Beury² · David Hot² · Corinne Gower-Rousseau¹ · Mathilde Body-Malapel¹

Received: 6 March 2018 / Accepted: 17 May 2018 / Published online: 26 May 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

The mycotoxin deoxynivalenol (DON) is a frequent contaminant of cereals and their by-products in areas with a moderate climate. Produced by *Fusarium* species, it is one of the most prevalent mycotoxins in cereal crops worldwide, and the most frequently occurring type B trichothecene in Europe. Due to its toxic properties, high stability and prevalence, the presence of DON in the food chain could represent a major public health risk. However, despite its well-known acute toxicological effects, information on the adverse effects of realistic exposure remains limited. We orally exposed mice during 9 months to DON at doses relevant for currently estimated human intake and explored the impact on various gut health parameters. DON exposure induced recruitment of regulatory B cells, and activation of regulatory T cells and dendritic cells in mesenteric lymph nodes. Several inflammatory parameters were increased in colon of DON-exposed mice, whereas inversely inflammatory markers were decreased in ileum. Histomorphological impairments were observed from the duodenum to the colon. Both colon and jejunum presented a hyperproliferation of epithelial cells and an increased expression of mature absorptive cells markers. Finally, DON exposure reshaped gut microbial structure and drastically disturbed the abundance of several bacterial phyla, families, and genera, leading to dysbiosis. Chronic oral exposure to human relevant doses of DON induces several disturbances of gut homeostasis with likely pathological implications for susceptible individuals.

Keywords Mycotoxin · Deoxynivalenol · Inflammation · Microbiota · Intestine · Colon

Introduction

The mycotoxin deoxynivalenol (DON) is one of the most prevalent mycotoxins present in cereal crops worldwide [EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) et al. 2017]. DON is a fungal secondary metabolite, produced by the species *Fusarium*, mainly by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. DON is the most

frequently occurring type B trichothecene in Europe. Trichothecenes are characterized by a high stability under different environmental conditions and resistance to high temperature and to industrial processing of food/grains (Bretz et al. 2006). This high stability explains DON widespread presence in human food commodities. In this context, DON constitutes a very common contaminant of food stuff such as bread, breakfast cereals, baby food, pasta, pastries, pizza or beers (Rodrigues and Naehrer 2012). A large scale data survey indicated that DON is present in 57% of food samples collected in the European Union (European Food Safety Authority 2013). Analyses of urine samples led to the estimation that 98% of adults in the United Kingdom had been exposed to DON, while 80% of children in the Netherlands exceeded the tolerable daily intake for this mycotoxin (Pieters et al. 2002; Turner et al. 2008).

Several experiments performed mainly in vitro and ex vivo have shown that DON can inhibit intestinal absorption of nutrients, modulate the opening of tight junctions, increase bacterial translocation, decrease mucus and

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00204-018-2228-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Mathilde Body-Malapel
mathildebody@gmail.com

¹ Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U995-LIRIC-Lille Inflammation Research International Center, 59000 Lille, France

² Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019-UMR8204-CIIL-Center for Infection and Immunity of Lille, 59000 Lille, France

β -defensin production and IgA secretion (Maresca 2013). Most of these effects on intestinal functions and immunity have been observed at micromolar doses. DON has a biphasic effect on the mitogen-induced proliferation of human and animal lymphocytes; 1–30 μ M of toxin stimulate the proliferation, whereas 100–600 nM of DON suppress it (Oswald et al. 2005; Taranu et al. 2010). Opposite effects of DON have also been observed on the secretion of IL-8, with an increase for doses below 20 μ M and a decrease for doses greater than 30 μ M, confirming the interest of carrying out the studies with realistic doses (Maresca 2013). Tardivel et al provided the first demonstration that subchronic administration of low DON doses (25 μ g/kg bw/day) in mice results in a low-grade inflammation state, as evidenced by increased IL-1 β expression in plasma, adipose tissue, duodenum, and brain after 10 days of intoxication (Tardivel et al. 2015). IL-1 β was also enhanced in blood, adipose tissue, liver and brain after 30 days of exposure to 2.5 μ g/kg bw/day of DON. In this study, only the duodenum has been analyzed at the intestinal level. Actually, even if numerous studies argue in favor of a deleterious impact of DON oral exposure on the gastro-intestinal tract, effects of a realistic exposure to DON on gut homeostasis have never been assessed. The aim of this study was to evaluate these effects following chronic intoxication with DON given at a realistic human dietary dose. For this purpose, mice were exposed for a duration of 9 months, which is commonly used to evaluate the tissular effects of long-term exposure to environmental pollutants (Grignard et al. 2008; Simet et al. 2010; Wold et al. 2012; Gueguen et al. 2014). The dose used of 10 μ g/kg/bw/day has been chosen based on the human exposure data available in the literature; indeed, based on cereal and food commodity DON concentrations and diet consumption data, the total DON human intake was estimated in 2011 to range from 0.2 in the African diet to 14.5 μ g/kg bw/day in the Middle Eastern diet [EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) et al. 2017]. Furthermore, a recent risk assessment study performed in Norway has showed that the high (95th-percentile) exposure exceeded the TDI (1 μ g/kg bw/day) by up to 3.5 times in 1-, 2-, 4-, and 9-year-old children (Sundheim et al. 2017). A quantification of major parameters of intestinal inflammation and epithelial proliferation as well as a metagenomics analysis of the gut microbiota were performed.

Methods

Mice and experimental design

Male C57BL/6 mice (aged 7 weeks) were purchased from Janvier Labs and housed under standard conventional conditions. Mice experiments were performed in accordance

with the guidelines of European legislation (Council Directive 2010/63/UE) and French Decree 2013-118 on the protection of animals used for scientific purposes. They were approved by the local bioethics committee (Committee No. 75; Authorization No. 2017031312157794CEE40). Ten mice were allocated into each study group. Mice received 10 μ g/kg bw/day of deoxynivalenol (Cayman) diluted in their drinking water or vehicle (ethanol 0.05%) for control mice. The intoxication lasted 280 days (9 months). At necropsy, mesenteric lymph nodes, duodenum, jejunum, ileum, cecum and colon were sampled.

Flow cytometry

Cells were harvested from mesenteric lymph nodes and were washed in PBS with 2% fetal calf serum. Cellular suspensions were incubated with antibodies (BD Biosciences, San Diego, USA) for 30 min in PBS before being washed twice and suspended in PBS with 2% fetal calf serum. The following combinations of antibodies were used:

- FITC-conjugated anti-I-Ab; PE-conjugated anti-F4/80; PerCP/Cy5-conjugated anti-CD103; PE/Cy7-conjugated anti-CD11c; APC-conjugated anti-CCR2; Alexa700-conjugated anti-CD86; APC-H7-conjugated anti-Ly6G; V450-conjugated anti-CD11b; V500-conjugated anti-CD45; BV605-conjugated anti-Ly6C;
- FITC-conjugated anti-CD5; PE-conjugated anti-CD1d tetramer (NIH tetramer facility); PerCP/Cy5-conjugated anti-NK1.1; APC-conjugated anti-CD25; Alexa700-conjugated anti-CD69; APC-H7-conjugated anti-CD4; V450-conjugated anti-TCR- β ; V500-conjugated anti-CD8 and BV605-conjugated anti-CD45;
- FITC-conjugated anti-CD5; PE-conjugated anti-CD1d; PerCP/Cy5-conjugated anti-IgD; PE/Cy7-conjugated anti-CD19; APC-conjugated anti-IgM; APC-H7-conjugated anti-CD43; V450-conjugated anti-CD11b; V500-conjugated anti-CD45; PE-CF594-conjugated anti-CD23.

Cells were analyzed on a LSR Fortessa (BD Biosciences). Generated data were analyzed using FlowJo 8.7 (Treestar, Stanford, CA, USA).

Myeloperoxidase (MPO) activity assay

Mice tissues were homogenized in 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (Sigma-Aldrich) in 50 mM PBS, freeze-thawed three times, and centrifuged. MPO was analyzed in the clear supernatant by adding 1 mg/mL of dianisidine dihydrochloride (Sigma-Aldrich) and 5×10^{-4} % hydrogen peroxide (H_2O_2), and the change in optical density was measured at 450 nm. Human neutrophil MPO

(Sigma–Aldrich) was used as a standard. One unit of MPO activity was defined as the amount that degraded 1.0 μmol of peroxide per min at 25 °C. Readings from tissue samples were normalized to total protein content as detected using the DC™ protein assay (Bio–Rad).

Malondialdehyde (MDA) analysis

Tissues were homogenized with a Precellys®24 homogenizer (Bertin Technologies) in cold phosphate buffered saline and centrifuged at 10,000 $\times g$ for 15 min at 4 °C. Supernatants were incubated with acetic acid, SDS and 2-thiobarbituric acid at 95 °C for 1 h, followed by centrifugation at 800 g for 10 min. Supernatants were transferred to a 96-well plate and the fluorescence intensity was measured at $\lambda_{\text{ex}} = 532$ and $\lambda_{\text{em}} = 553$ nm. 1,1,3,3-Tetramethoxypropane (Sigma–Aldrich) was used as standard. Protein concentration in samples was determined using the DC™ protein assay (Bio–Rad Laboratories). MDA concentration was corrected by the sample protein concentration and is expressed as nanomoles per mg of protein.

Histological analysis

Tissues were fixed in 4% paraformaldehyde overnight, processed, and embedded in paraffin wax by standard techniques. Serial histological sections of 4 μm thickness were cut, deparaffinized, rehydrated, and stained with May–Grünwald–Giemsa (MGG) for morphometric analysis under a light microscope (Leica DM5500B). Histological score was assessed by quantifying the intensity of the inflammatory cell infiltrate (score 0–3) and the tissue damage (score 0–3) as previously described (Yan et al. 2009). Briefly, the presence of occasional inflammatory cells in the lamina propria was scored as 0, increased numbers of inflammatory cells in the lamina propria as 1, confluence of inflammatory cells extending into the submucosa as 2, and transmural extension of the infiltrate as 3. For tissue damage, scores were: 0, no mucosal damage; 1, lymphoepithelial lesions; 2, surface mucosal erosion or focal ulceration; 3, extensive mucosal damage and extension into deeper structures of the bowel wall. The combined histological score ranged from 0 (no changes) to 6 (extensive infiltration and tissue damage). Epithelial area in the colon, villus height and crypt depth in the ileum, jejunum, and duodenum were measured using ImageJ software. At least 100 well-oriented mucosa, villi and crypts were measured in at least five individual mice from each group for this study.

Gene expression in tissues

Total mRNA from intestinal tissues was extracted using a Nucleospin RNA kit (Macherey Nagel). Reverse

transcription was performed using a high-capacity cDNA archive kit and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) with SYBR Green (Life Technologies). The primer sequences were designed using Primer Express 3 (Life Technologies) and are available upon request. Melting curve analyses were performed for each sample and gene to confirm the specificity of the amplification. Because the exposure to DON did not cause any significant alterations in *Polr2a* mRNA expression, the relative expression of each gene of interest was normalized to the relative expression of this gene. The quantification of the target gene expression was based on the comparative cycle threshold (Ct) value. The fold changes in the target genes were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen 2001).

16S rRNA gene sequencing

We isolated DNA from cecum collected during necropsy using ZR fecal DNA Kit (Zymo Research) according to the manufacturer's instructions. The resultant DNA was quantified by ultraviolet spectroscopy and stored at -80 °C. DNA was amplified using universal primers Bact-0341, 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' and Bact-0785, 5'-GACTAC HVGGGTATCTAATCC-3' to target the V3–V5 regions of 16S rRNA of bacteria (Herlemann et al. 2011). Individual samples were barcoded, pooled to construct the sequencing library, and then sequenced using an Illumina Miseq (Illumina, San Diego, CA) to generate paired-end 2×300 bp reads.

Analysis of 16S rRNA sequencing data

The paired-end reads were first merged using PEAR v0.9.1 (Zhang et al. 2014) and then analyzed using the QIIME pipeline v1.9.1 (Caporaso et al. 2010). Quality was controlled and reads were filtered: reads smaller than 132 nt and longer than 500 nt were discarded, no quality trimming was performed due to the high quality of the sequencing leading to 558,772 reads kept at this step for the 15 samples. Chimera reads were removed using the script identify_chimeric_seqs.py with USEARCH leading to a set of 488,207 reads. The OTU clustering was done at 97% similarity level against the GreenGenes database v13_8 (McDonald et al. 2012) using the script pick_open_reference_otus.py (option -m sortmerna_sumaclus). Singletons were removed using the script filter_otus_from_otu_table.py leading to 461,073 reads distributed in 18,055 OTUs. Data were then normalized using the script normalize_table.py (option CSS). Alpha diversity and beta-diversity (weighted and unweighted UniFrac) analyses were performed with QIIME scripts. Differential OTU abundance analyses between DON-exposed and control groups were performed with STAMP (Parks et al. 2014)

using the Welch's test two-side and the Benjamini–Hochberg FDR correction.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. The statistical significance of differences between experimental groups was calculated using the Mann–Whitney *U* test (GraphPad, San Diego, CA). For all experiments, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.005, *****p* < 0.001.

Results

After 9 months of exposure, no mortality or any gross behavioral change were observed in mice. No weight loss occurred, but at the end of exposure, DON-exposed mice had gained slightly less weight than control mice (Fig. S1).

Exposure to DON affects immune cells recruitment and activation in mesenteric lymph nodes

Mesenteric lymph nodes (MLN) are involved in intestinal homeostasis both in steady state and during inflammation (Kawabe et al. 2016). We performed antigen-presenting cells, B- and T-cell immunophenotyping. Ly6G[−] CD11b[−] Ly6C⁺ CCR2⁺ inflammatory monocytes, Ly6G⁺ CD11b⁺ polymorphonuclear neutrophils (PMN), and different T-cell immune populations, i.e. TCRβ⁺ conventional T, either CD4⁺ or CD8⁺, TCRβ⁺ CD1d-tetramer⁺ invariant NKT (iNKT), NK1.1⁺CD5[−] NK and NK1.1⁺ CD5⁺ NKT-like cells did not show any quantitative variation between MLN of control and DON-exposed mice (Fig. S2a–c). The number of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells remained also unchanged (Fig. 1a), but the activation markers CD69 and CD25 were increased on these CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells (Fig. 1b). The number of CD19⁺ CD43[−] IgM⁺ IgD[−] CD5⁺ CD23⁺ regulatory B cells was higher in MLN of DON-exposed mice compared to control mice, whereas the number of total B cells and other B-cell subpopulations were unchanged (Figs. 1c; S1d, and data not shown). Regarding CD11c⁺ MHC class II⁺ F4/80[−] dendritic cells (DC), no variation was observed in the number of total DC, CD103[−] CD11b⁺ inflammatory DC and CD103⁺ CD11b[−] resident DC (Fig. 1d). Noteworthy, CD86 expression was significantly decreased in both inflammatory and resident DC (Fig. 1e).

Exposure to DON differently alters inflammatory parameters in duodenum, jejunum, ileum and colon

The myeloperoxidase (MPO) is an enzyme found in neutrophils and monocytes that catalyzes radical production and

modulates macrophage functions. MPO activity was chosen as a general inflammation marker. MPO activity was significantly higher in colon and jejunum of DON-intoxicated mice compared to those of control mice (Fig. 2a). In ileum, DON exposure induced a decrease of MPO activity. Besides, as malondialdehyde (MDA) is one of the most prevalent byproducts of lipid peroxidation during oxidative stress, MDA assay was used to assess oxidative stress (Fig. 2b). Following DON exposure, MDA levels were significantly increased and decreased in colon and ileum, respectively. Consistently, histological scoring confirmed the higher inflammatory rate in colon of DON-exposed mice (Fig. 2c). Moreover, mRNA transcripts levels of the cytokine *Ifn-γ* and the chemokines *Ccl3* (also known as *Mip1a*) and *Ccl5* (also known as *RANTES*) were enhanced in colon of DON-exposed mice (Fig. 2d). Levels of the cytokine *Il-1β*, the chemokines *Ccl2* (also known as *Mcp-1*) and *Cxcl1* (also known as *KC*) were significantly decreased in ileum following DON exposure (Fig. 2e).

Exposure to DON affects intestinal epithelial cells turnover

We next performed a histomorphometrical analysis of intestinal tissues (Fig. 3). In duodenum, the villus height was reduced and the crypt depth was increased, leading to a villus/crypt ratio reduced by 29% in DON-exposed mice compared to control mice (Fig. 3a–d). In jejunum, the villus/crypt ratio was also reduced, because of a crypt depth increased (Fig. 3a–d). In ileum, a significant increase of crypt depth was observed, which did not lead to a significant variation of the villus/crypt ratio (Fig. 3a–d). Colon epithelial homeostasis was assessed by measuring epithelial cell area (Fig. 3e, f). It was significantly higher in DON-exposed mice compared to control mice, suggesting a proliferative effect of DON on gut epithelial cells. We then assessed intestinal cells proliferation by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining (Fig. 4a). PCNA-positive cells were more numerous in colon and jejunum of DON-intoxicated mice as compared with tissues of control mice. Then we quantified transcript expression of *Villin* and alkaline phosphatase (*Alpi*) as markers of mature absorptive epithelial cell (Fig. 4b). *Villin* and *Alpi* mRNA levels were higher in both jejunum and colon of DON-exposed mice compared to those of control mice.

Exposure to DON alters gut microbiota composition

To assess the impact of experimental exposure to DON on dominant bacterial communities, we sequenced V3–V5 amplicons of 16S rRNA genes. After merging, trimming and chimera filtering, we obtained a total of 488,207 reads (32,547 \pm 6721 reads per sample) with a mean length of

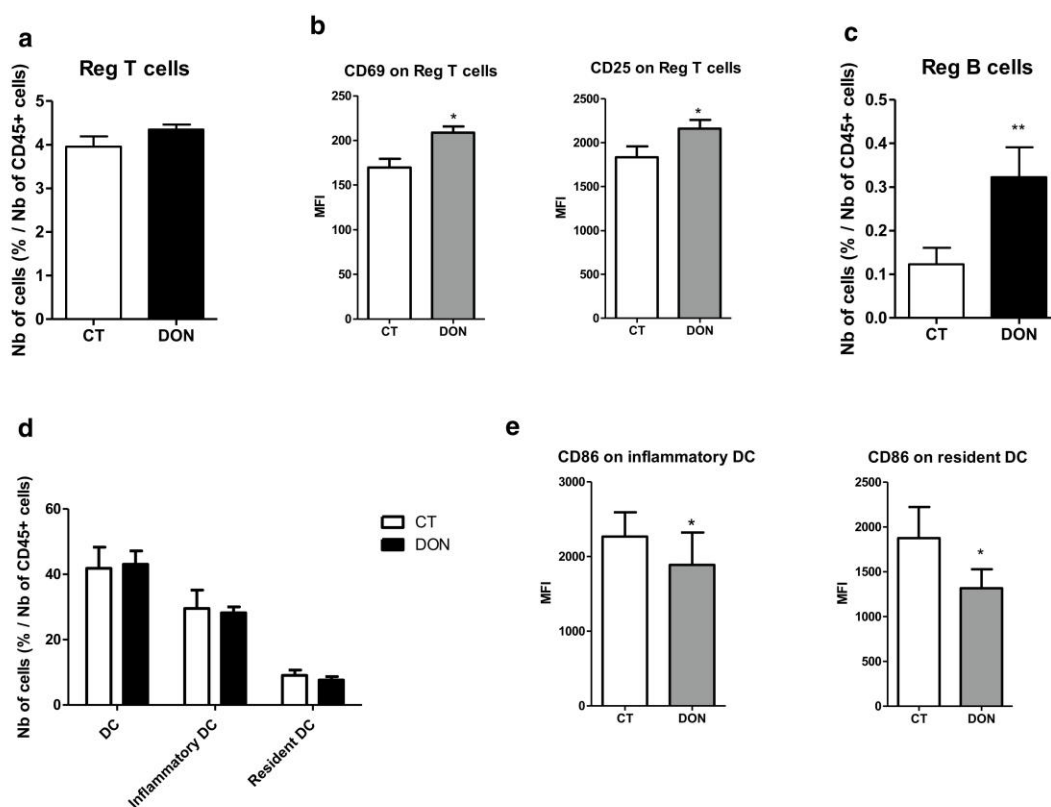


Fig. 1 Effects of DON exposure on immune populations in mesenteric lymph nodes from mice exposed to DON (DON, $n=10$) compared to control mice (CT, $n=10$). **a** Proportion of regulatory T cells. **b** Mean fluorescence intensity (MFI) of CD69 (left) and CD25 (right)

on regulatory T cells. **c** Proportion of regulatory B cells. **d** Proportion of total, inflammatory and resident DC. **e** Mean fluorescence intensity of CD86 on inflammatory DC (left) and resident DC (right)

450 bp. Exposure to DON did not significantly affect alpha diversity (Shannon diversity index: Control 9.78 ± 0.21 ; DON 9.24 ± 0.32 , p value 0.4634 Mann–Whitney–Wilcoxon test). After taxonomic assignment of operational taxonomic units (OTUs), the effect of DON was assessed on the abundance of phyla, families, and genera. Taxonomic assignment at the phylum level of OTUs, with each color representing an individual bacterial phylum, is shown in Fig. 5a. As expected, mice presented usual interindividual variations, with a bacterial composition dominated by members of the *Firmicutes* (Fig. 5a). Figure 5b shows that exposure to DON significantly enriched the representation of *Deferribacteres*, *Proteobacteria*, *TM7*, *Verrucomicrobia*, *Tenericutes* and *Cyanobacteria*. The abundance of *Actinobacteria* and *Bacteroidetes* was significantly lower in DON-exposed mice compared to control mice. Furthermore, both at the family and genus levels, several significant differences in taxonomic

abundances between DON and control mice were observed (Fig. 5c, d). The proportion of *Odoribacteraceae*, *Enterobacteriaceae*, *Deferribacteraceae*, *F16*, *Turicibacteraceae*, and *Helicobacteraceae* families were increased in DON-exposed mice compared to control mice (Fig. 5c). DON exposure induced a decrease of the proportion of *Coriobacteriaceae*, *S-24-7*, and *Streptococcaceae* families. At the genus level, higher proportions of *Odoribacter*, *Mucispirillum*, *Helicobacter*, and lower proportions of *Adlercreutzia*, *Dorea*, *Bifidobacterium*, and *Streptococcus* were observed in DON-exposed mice compared to control mice (Fig. 5d). The difference in the gut microbiome profiles arising from DON exposure was also observed using Principal Coordinate Analysis, as shown in Fig. 6. The two groups are clearly divided with the PC1 axis capturing more than 67.9% of the variation in the input data and PC2 22.5% of the variation at the family level. These results were confirmed performing

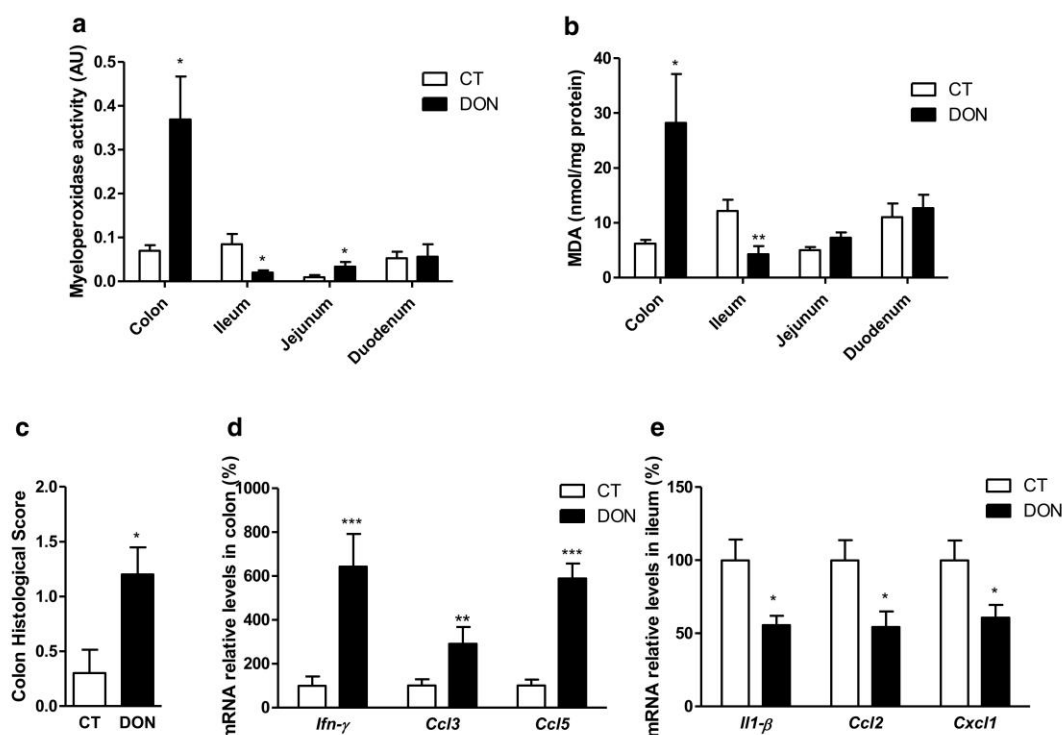


Fig. 2 Effects of DON exposure on gut inflammatory status in mice exposed to DON (DON, $n=10$) compared to control mice (CT, $n=10$). **a** Myeloperoxidase activity and **b** malondialdehyde (MDA) levels, in colon, ileum, jejunum and duodenum. **c** Histological score

of inflammation in colon. **d** Relative expression levels of *Ifn-γ*, *Ccl3* and *Ccl5* mRNA in colon. **e** Relative expression levels of *Il1-β*, *Ccl2* and *Cxcl1* mRNA in ileum

beta-diversity analysis using unweighted and weighted Unifrac which further demonstrated statistically significant separation of microbial profiles between control and DON-exposed mice (unweighted $R^2=0.116$, p value = 0.001, weighted $R^2=0.148$, p value = 0.003).

Discussion

In this study, we assessed the effect of an oral chronic exposure of DON at a dosage which is realistic for human exposure (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day) [EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) et al. 2017]. We first investigated the immune status of mesenteric lymph nodes, because MLN has a critical role in both development of resolution of enteritis and colitis. We first demonstrated that DON exposure induced an activation of regulatory T cells in MLN. Similarly a decreased number of regulatory T cell has been observed in MLN of rats perinatally exposed to bisphenol A: this regulatory T-cells decrease was associated

with an impaired response to food antigens and an increased susceptibility to intestinal parasitic infection (Ménard et al. 2014). We have also observed a recruitment of regulatory B cells. As regulatory B cells have been shown to both exacerbate (Zhu et al. 2017) and attenuate (Sattler et al. 2014) mucosal inflammatory response in the gut, further studies are needed to determine the functional impact of these cells in the context of DON exposure. Exposure to DON also induced inhibition of the co-stimulatory factor CD86 in both inflammatory and resident DC. This can be attributed to regulatory T cells which are able to inhibit CD86 expression in DC, that attenuates dendritic cell maturation and stimulatory function (Mavin et al. 2017). Accordingly, it has been well documented that DC can be arrested at a semi-mature status following treatment with regulatory T cells, rendering them deficient in stimulating CD4^+ T cell proliferation (Mahnke et al. 2007). Activation of regulatory T cells is, therefore, concordant with inhibition of co-stimulatory factor in DC. Reciprocally, in the intestine, resident DC play a crucial role in tolerogenic responses including regulatory T

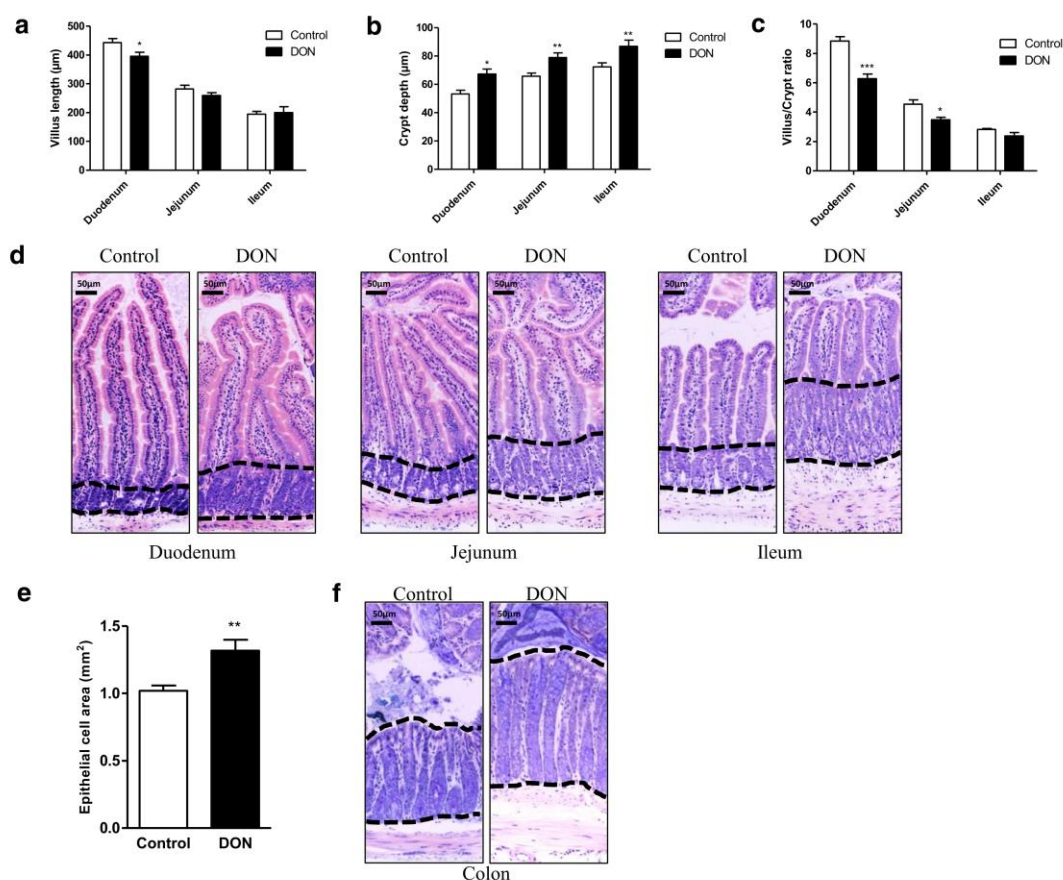


Fig. 3 Effects of DON exposure on intestinal histomorphology in mice exposed to DON (DON, $n = 10$) compared to control mice (Control, $n = 10$). **a** Villus length. **b** Crypt depth. **c** Villus/crypt ratio of

small intestinal tissues. **d** Representative photomicrographs of small intestinal tissues. Scale bar 50 µm. **e** Epithelial area in colon. **f** Representative photomicrographs of colon tissues. Scale bar 50 µm

cell induction (Scott et al. 2011). Therefore, it appears that several mechanisms are activated in DON-exposed mice to induce immunomodulatory and tolerogenic properties of immune populations present in MLN. Further studies are needed to determine whether this induced tolerance in MLN is a beneficial mechanism to counteract certain effects of DON in intestinal tissues or whether this tolerance exacerbates the immune dysregulation caused by DON.

Previous studies have shown that exposure to DON induces numerous and paradoxical deleterious effects on intestinal tissues. In this work, for the first time to our knowledge, the whole small intestine and noteworthy the colon were analyzed. Regarding inflammation, the duodenum, which did not present any variation of MPO activity and MDA levels, seemed to be the less affected intestinal

tissue. Jejunum presented only an enhanced MPO activity. Ileum showed a decrease of both MPO activity and MDA levels, as well as of *Il-1β*, *Ccl2* and *Cxcl1* transcripts levels, all concurring towards an immunosuppression induced by DON exposure in ileum. By contrast, in colon, the numerous inflammatory parameters significantly higher in DON-exposed mice compared to control mice (namely, MPO activity, MDA levels, histological score, and *Ifn-γ*, *Ccl3* and *Ccl5* transcripts levels) strongly argue in favor of pro-inflammatory effects of DON exposure in colon. These results show that the effects of DON exposure on inflammation are dependent of the intestinal localization. This tissue-dependent effect of DON has already been observed in the intestinal tract, with by instance an increase of *Il-1β* in duodenum and a decrease of *Il-1β* in jejunum, following

10 days exposure to DON (0.9 mg/kg feed) in growing piglets (Alizadeh et al. 2015). These results are consistent with the compartmentalization of the immune response which is well known in the intestinal tract (Houston et al. 2016).

In contrast to the effects on inflammation that appear to be tissue specific, the observed effects on epithelial proliferation seems to follow a gradient along the small intestine; indeed, the quantitative morphological analysis showed a decreasing effect of DON, from the most affected tissue, the duodenum, which showed both decreased villus height and increased crypt depth, to the ileum, which present only an increase of crypt depth. These data are consistent with previous studies which found impairment of intestinal morphology in small intestine of DON-exposed animals (Akbari et al. 2014; Alizadeh et al. 2015; Wu et al. 2015; Przybylska-Gornowicz et al. 2015). In colon, the disruption of epithelial proliferation is evidenced by the increase of epithelial cell

area in DON-exposed mice. The higher number of proliferating cells in the crypts of colon and jejunum of DON-exposed mice confirms the hyperproliferative effect of DON on intestinal epithelial cells. This rise of proliferation is associated with an enhancement of expression of two absorptive cell markers, *Villin* and *Alpi*, in jejunum and colon, showing a disruption of epithelial cells differentiation. These results suggest that at this low level, DON clearly influences the epithelial cell turnover both in small intestine and in colon.

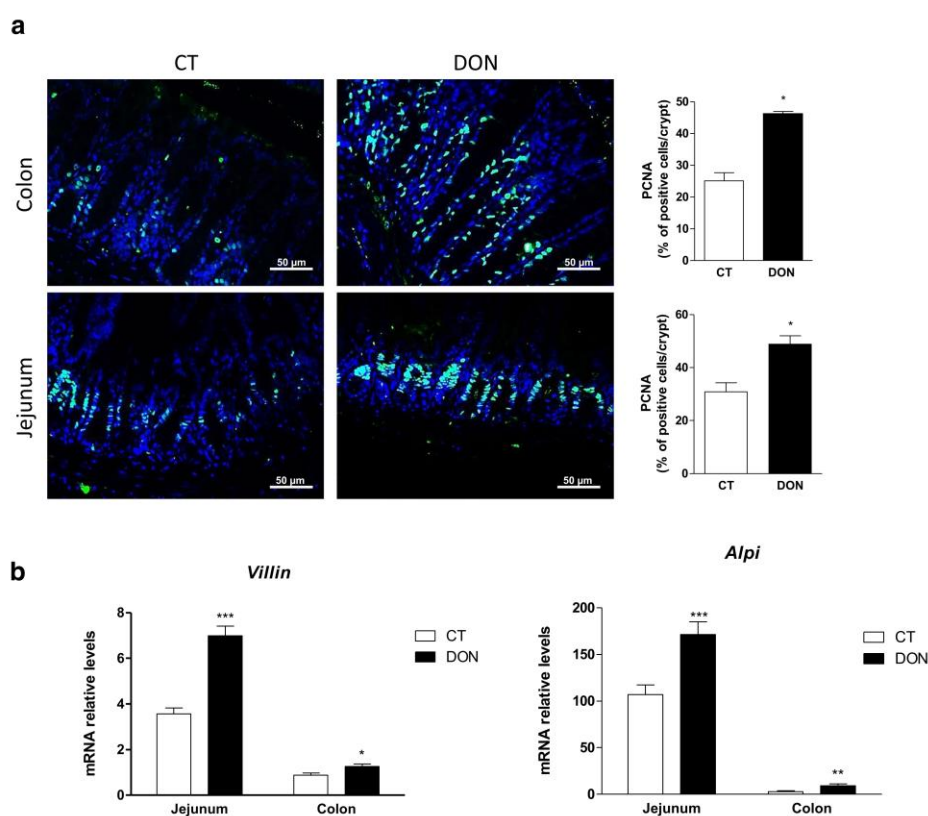
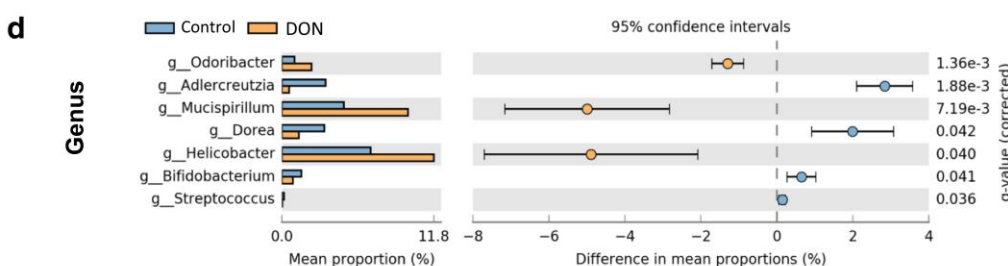
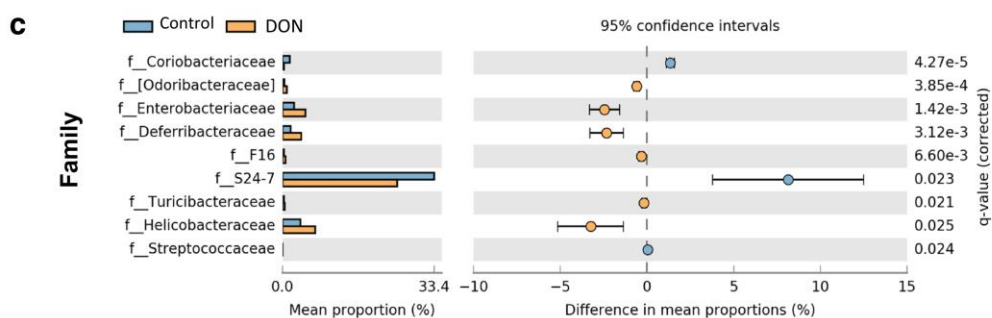
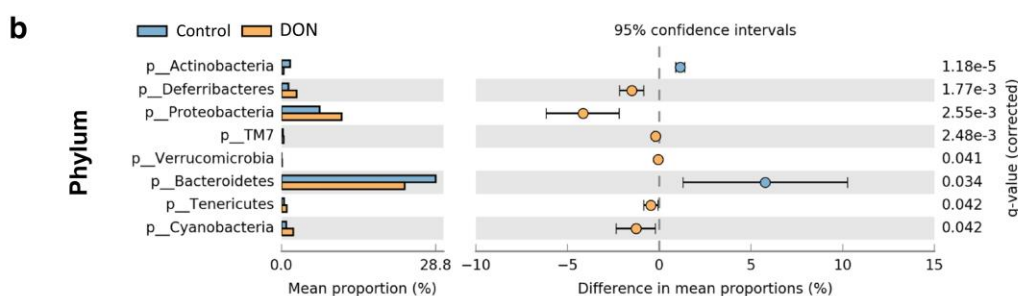
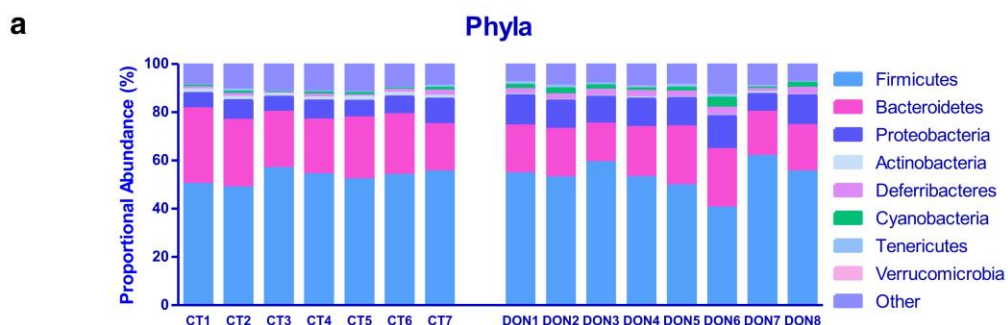


Fig. 4 Effects of DON exposure on intestinal epithelial cell proliferation in mice exposed to DON (DON, $n=10$) compared to control mice (CT, $n=10$). **a** PCNA immunostaining of colon and jejunum

(left panel, scale bar 50 μ M), and their quantification (right panel). **b** Relative expression levels of *Villin* and *Alpi* in colon and jejunum



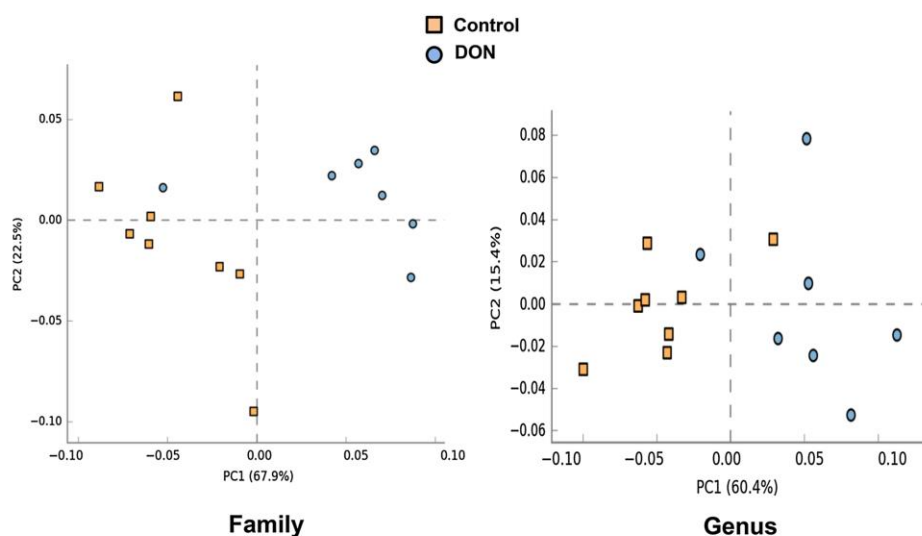


Fig. 6 Comparison of microbial community diversity presented as PCoA plots at the family (left panel) and genus (right panel) level in mice exposed to DON (DON, $n=8$) compared to control mice (Control, $n=7$)

Among the most striking features revealed by metagenomics analysis of cecum microbiota are the decrease of *Bacteroidetes* and the increase of *Proteobacteria* in DON-exposed mice compared to control mice. The decrease of *Bacteroidetes* is also a feature of patients with IBD, as confirmed by a meta-analysis (Zhou and Zhi 2016). *Bacteroidetes* express polysaccharide A, which can induce regulatory T-cell growth and cytokines expression that are protective against colitis (Round et al. 2011). Moreover, *Proteobacteria* are often found to be increased in metabolic disorders and IBD, and have been identified by some authors as a possible marker of microbiota instability, thus predisposing to the onset of these diseases (Rizzatti et al. 2017). Dysbiotic *Proteobacteria* expansion is also considered as a microbial signature of gut epithelial dysfunction (Litvak et al. 2017). In various mouse models of colitis, positive correlations have been established between *Proteobacteria* and gut inflammation (Maharshak et al. 2013; Selvanantham et al. 2016). More specifically, *Enterobacteriaceae* which belong to *Proteobacteria* are among the most commonly overgrown symbionts in many conditions involving inflammation, such as IBD, obesity, colorectal cancer, celiac disease, and antibiotic treatment (Zeng et al. 2017). In our study, the proportion of *Enterobacteriaceae* is almost two-fold higher in DON-exposed mice compared to control mice. These results suggest that the enterobacterial bloom induced by DON exposure could contribute to its effects on intestinal inflammation.

Another interesting feature of DON-induced dysbiosis is the lower proportion of *Coriobacteriaceae* family and *Adlercreutzia* genus. *Coriobacteriaceae* have been found to be more abundant in Crohn's disease patients than control patients (Hansen et al. 2012) and inversely less abundant in fecal samples of pediatric IBD patients (Maukonen et al. 2015). *Adlercreutzia* are also decreased in IBD patients (Shaw et al. 2016). In stool, *Adlercreutzia* are less abundant in patients with colorectal cancer (Wang et al. 2017), whereas in luminal samples, CRC patients were enriched in members of the family *Coriobacteriaceae* (Chen et al. 2012). Notably, *Coriobacteriaceae* increased in abundance on a gluten-free diet (Bonder et al. 2016). *Coriobacteriaceae* and particularly *Adlercreutzia* are also enriched following low-fermentable substrate diet intervention in responders (Chumpitazi et al. 2014). *Coriobacteriaceae* are also less abundant in gluten-sensitive macaques (Mohan et al. 2016) but paradoxically *Coriobacteriaceae* are higher in celiac disease infants than in healthy controls (Collado et al. 2007). Therefore, despite somehow conflicting results, modifications of the proportion of *Coriobacteriaceae* and *Adlercreutzia* have been repeatedly associated with chronic disorders of the digestive tract.

Another compelling hallmark of DON-induced dysbiosis is the higher proportion of *Odoribacteraceae* family and of the *Odoribacter* genus. *Odoribacter* are reduced in Crohn's disease patients (Wang et al. 2017). By contrast, the relative abundance of *Odoribacter* is higher in mouse with DSS-induced colitis (Yang et al. 2017). *Odoribacter*

have also been found enriched in a mouse model of inflammation-driven colon cancer (Zackular et al. 2013; Yamamoto and Matsumoto 2016). Our study also revealed that DON exposure led to an higher amount of *Mucispirillum*, which are mucin-degrading bacteria that could contribute to the known effects of DON on intestinal barrier (Berry et al. 2012; Rauch et al. 2014). Finally, this metagenomics analysis showed that the microbiota of mice which have been exposed to DON presents several important features of dysbiosis, which can influence the susceptibility to chronic diseases of the intestinal tract.

Conclusion

In conclusion, chronic ingestion of DON at human dietary level impairs multiple parameters of intestinal homeostasis including gut microbiota composition, immune response, morphology and epithelial proliferation. This work confirms that intestinal tract is highly susceptible to DON, and that it is worthy to further assess the role of DON in intestinal diseases, including inflammatory bowel diseases, food-allergic enteropathy and colorectal cancer.

Acknowledgements We thank the animal facility of Lille University Hospital for the animal care.

Funding This work was supported by grants from the FHU Imminent and Digestscience (European Research Foundation on Intestinal Diseases and Nutrition).

Compliance with ethical standards

Ethical approval All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.

Research involving human participants and/or animals This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

References

- Akbari P, Braber S, Gremmels H et al (2014) Deoxynivalenol: a trigger for intestinal integrity breakdown. *FASEB J* 28:2414–2429. <https://doi.org/10.1096/fj.13-238717>
- Alizadeh A, Braber S, Akbari P et al (2015) Deoxynivalenol impairs weight gain and affects markers of gut health after low-dose, short-term exposure of growing pigs. *Toxins* 7:2071–2095. <https://doi.org/10.3390/toxins7062071>
- Berry D, Schwab C, Milinovich G et al (2012) Phylotype-level 16S rRNA analysis reveals new bacterial indicators of health state in acute murine colitis. *ISME J* 6:2091–2106. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.39>
- Bonder MJ, Tigchelaar EF, Cai X et al (2016) The influence of a short-term gluten-free diet on the human gut microbiome. *Genome Med* 8:45. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0295-y>
- Bretz M, Beyer M, Cramer B et al (2006) Thermal degradation of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol. *J Agric Food Chem* 54:6445–6451. <https://doi.org/10.1021/jf061008g>
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J et al (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7:335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Chen W, Liu F, Ling Z et al (2012) Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One* 7:e39743. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039743>
- Chumpitazi BP, Hollister EB, Oezguen N et al (2014) Gut microbiota influences low fermentable substrate diet efficacy in children with irritable bowel syndrome. *Gut Microbes* 5:165–175. <https://doi.org/10.4161/gmic.27923>
- Collado MC, Calabuig M, Sanz Y (2007) Differences between the fecal microbiota of coeliac infants and healthy controls. *Curr Issues Intest Microbiol* 8:9
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Knutson HK, Alexander J 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*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4718>
- European Food Safety Authority (2013) Deoxynivalenol in food and feed: occurrence and exposure. *EFSA J*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3379>
- Grignard E, Guéguen Y, Grison S et al (2008) In vivo effects of chronic contamination with 137 cesium on testicular and adrenal steroidogenesis. *Arch Toxicol* 82:583–589
- Gueguen Y, Rouas C, Monin A et al (2014) Molecular, cellular, and tissue impact of depleted uranium on xenobiotic-metabolizing enzymes. *Arch Toxicol* 88:227–239
- Hansen R, Russell RK, Reiff C et al (2012) Microbiota of de-novo pediatric IBD: increased *Faecalibacterium prausnitzii* and reduced bacterial diversity in Crohn's but not in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 107:1913–1922. <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.335>
- Herlemann DP, Labrenz M, Jürgens K et al (2011) Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic sea. *ISME J* 5:1571–1579. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>
- Houston SA, Cerovic V, Thomson C et al (2016) The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. *Mucosal Immunol* 9:468. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.77>
- Kawabe T, Suzuki N, Yamaki S et al (2016) Mesenteric lymph nodes contribute to proinflammatory Th17-cell generation during inflammation of the small intestine in mice. *Eur J Immunol* 46:1119–1131. <https://doi.org/10.1002/eji.201545907>
- Litvak Y, Byndloss MX, Tsolis RM, Bäumler AJ (2017) Dysbiotic Proteobacteria expansion: a microbial signature of epithelial dysfunction. *Curr Opin Microbiol* 39:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.07.003>
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 25:402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Maharshak N, Packey CD, Ellermann M et al (2013) Altered enteric microbiota ecology in interleukin 10-deficient mice during development and progression of intestinal inflammation. *Gut Microbes* 4:316–324. <https://doi.org/10.4161/gmic.25486>
- Mahnke K, Johnson TS, Ring S, Enk AH (2007) Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: a two-way relationship. *J Dermatol Sci* 46:159–167. <https://doi.org/10.1016/j.jderm.2007.03.002>

- 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>
- Maukonen J, Kolho K-L, Paasela M et al (2015) Altered fecal microbiota in paediatric inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 9:1088–1095. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv147>
- Mavin E, Nicholson L, Ahmed SR et al (2017) Human regulatory T cells mediate transcriptional modulation of dendritic cell function. *J Immunol* 198:138–146. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502487>
- McDonald D, Price MN, Goodrich J et al (2012) An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J* 6:610–618. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.139>
- Ménard S, Guzylack-Piriou L, Lencina C et al (2014) Perinatal exposure to a low dose of bisphenol A impaired systemic cellular immune response and predisposes young rats to intestinal parasitic infection. *PLOS One* 9:e112752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112752>
- Mohan M, Chow C-ET, Ryan CN et al (2016) Dietary gluten-induced gut dysbiosis is accompanied by selective upregulation of microRNAs with intestinal tight junction and bacteria-binding motifs in rhesus macaque model of celiac disease. *Nutrients* 8:684. <https://doi.org/10.3390/nu8110684>
- Oswald IP, Marin DE, Bouhet S et al (2005) Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. *Food Addit Contam* 22:354–360. <https://doi.org/10.1080/02652030500058320>
- Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P, Beiko RG (2014) STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinform Oxf Engl* 30:3123–3124. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>
- Pieters MN, Freijer J, Baars B-J et al (2002) Risk assessment of deoxynivalenol in food: concentration limits, exposure and effects. *Adv Exp Med Biol* 504:235–248
- Przybylska-Gornowicz B, Tarasiuk M, Lewczuk B et al (2015) The effects of low doses of two fusarium toxins, zearalenone and deoxynivalenol, on the pig jejunum. A light and electron microscopic study. *Toxins* 7:4684–4705. <https://doi.org/10.3390/toxins7114684>
- Rauch I, Hainzl E, Rosebrock F et al (2014) Type I interferons have opposing effects during the emergence and recovery phases of colitis. *Eur J Immunol* 44:2749–2760. <https://doi.org/10.1002/eji.201344401>
- Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G et al (2017) Proteobacteria: a common factor in human diseases. *BioMed Res Int*. <https://doi.org/10.1155/2017/9351507>
- Rodrigues I, Naehrer K (2012) A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *Toxins* 4:663–675. <https://doi.org/10.3390/toxins4090663>
- Round JL, Lee SM, Li J et al (2011) The toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science* 332:974–977. <https://doi.org/10.1126/science.1206095>
- Sattler S, Ling G-S, Xu D et al (2014) IL-10-producing regulatory B cells induced by IL-33 (BregIL-33) effectively attenuate mucosal inflammatory responses in the gut. *J Autoimmun* 50:107–122. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.01.032>
- Scott CL, Aumeunier AM, Mowat AM (2011) Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance? *Trends Immunol* 32:412–419. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.06.003>
- Selvanantham T, Lin Q, Guo CX et al (2016) NKT cell-deficient mice harbor an altered microbiota that fuels intestinal inflammation during chemically induced colitis. *J Immunol* 197:4464–4472. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601410>
- Shaw KA, Bertha M, Hofmekler T et al (2016) Dysbiosis, inflammation, and response to treatment: a longitudinal study of pediatric subjects with newly diagnosed inflammatory bowel disease. *Genome Med* 8:75. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0331-y>
- Simet SM, Sisson JH, Pavlik JA et al (2010) Long-term cigarette smoke exposure in a mouse model of ciliated epithelial cell function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43:635–640
- Sundheim L, Lillegaard IT, Fva este CK et al (2017) Deoxynivalenol exposure in Norway, risk assessments for different human age groups. *Toxins* 9:46. <https://doi.org/10.3390/toxins9020046>
- Taranu I, Marina DE, Burlacu R et al (2010) Comparative aspects of in vitro proliferation of human and porcine lymphocytes exposed to mycotoxins. *Arch Anim Nutr* 64:383–393. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2010.492140>
- Tardivel C, Airault C, Djelloul M et al (2015) The food born mycotoxin deoxynivalenol induces low-grade inflammation in mice in the absence of observed-adverse effects. *Toxicol Lett* 232:601–611. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.12.017>
- Turner PC, Burley VJ, Rothwell JA et al (2008) Deoxynivalenol: rationale for development and application of a urinary biomarker. *Food Addit Contam Part Chem Anal Control Expo Risk Assess* 25:864–871. <https://doi.org/10.1080/02652030801895040>
- Wang X, Wang J, Rao B, Deng L (2017) Gut flora profiling and fecal metabolite composition of colorectal cancer patients and healthy individuals. *Exp Ther Med* 13:2848–2854. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4367>
- Wold LE, Ying Z, Hutchinson KR et al (2012) Cardiovascular remodeling in response to long-term exposure to fine particulate matter air pollution clinical perspective. *Circ Heart Fail* 5:452–461
- Wu L, Liao P, He L et al (2015) Dietary l-arginine supplementation protects weanling pigs from deoxynivalenol-induced toxicity. *Toxins* 7:1341–1354. <https://doi.org/10.3390/toxins7041341>
- Yamamoto M, Matsumoto S (2016) Gut microbiota and colorectal cancer. *Genes Environ* 38:11. <https://doi.org/10.1186/s41021-016-0038-8>
- Yan Y, Kolachala V, Dalmasso G et al (2009) Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One* 4:e6073
- Yang Y, Chen G, Yang Q et al (2017) Gut microbiota drives the attenuation of dextran sulphate sodium-induced colitis by Huangqin decoction. *Oncotarget* 8:48863. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16458>
- Zackular JP, Baxter NT, Iverson KD et al (2013) The gut microbiome modulates colon tumorigenesis. *mBio* 4:e00692–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00692-13>
- Zeng MY, Inohara N, Nunez G (2017) Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol* 10:18–26. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.75>
- Zhang J, Kobert K, Flouri T, Stamatakis A (2014) PEAR: a fast and accurate Illumina paired-end reAd mergeR. *Bioinform Oxf Engl* 30:614–620. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu593>
- Zhou Y, Zhi F (2016) Lower level of bacteroides in the gut microbiota is associated with inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *BioMed Res Int* 2016:5828959. <https://doi.org/10.1155/2016/5828959>
- Zhu J, Xu Y, Zhu C et al (2017) IL-33 induces both regulatory B cells and regulatory T cells in dextran sulfate sodium-induced colitis. *Int Immunopharmacol* 46:38–47. <https://doi.org/10.1016/j.intim.2017.02.006>

Références bibliographiques

- Abbasi, S., & Turner, A. (2021). Human exposure to microplastics : A study in Iran. *Journal of Hazardous Materials*, 403, 123799. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123799>
- Abegunde, A. T., Muhammad, B. H., Bhatti, O., & Ali, T. (2016). Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases : Evidence based literature review. *World Journal of Gastroenterology*, 22(27), 6296. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i27.6296>
- Afzaal, M., Saeed, F., Shah, Y. A., Hussain, M., Rabail, R., Socol, C. T., Hassoun, A., Pateiro, M., Lorenzo, J. M., Rusu, A. V., & Aadil, R. M. (2022). Human gut microbiota in health and disease : Unveiling the relationship. *Frontiers in Microbiology*, 13, 999001. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.999001>
- Ahlawat, S., Asha, & Sharma, K. K. (2021). Gut–organ axis : A microbial outreach and networking. *Letters in Applied Microbiology*, 72(6), 636-668. <https://doi.org/10.1111/lam.13333>
- Akanyange, S. N., Zhang, Y., Zhao, X., Adom-Asamoah, G., Ature, A.-R. A., Anning, C., Tianpeng, C., Zhao, H., Lyu, X., & Crittenden, J. C. (2022). A holistic assessment of microplastic ubiquitousness : Pathway for source identification in the environment. *Sustainable Production and Consumption*, 33, 113-145. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2022.06.020>
- Akbari, P., Braber, S., Gremmels, H., Koelink, P. J., Verheijden, K. A. T., Garssen, J., & Fink-Gremmels, J. (2014). Deoxynivalenol : A trigger for intestinal integrity breakdown. *The FASEB Journal*, 28(6), 2414-2429. <https://doi.org/10.1096/fj.13-238717>
- Alizadeh, A., Braber, S., Akbari, P., Garssen, J., & Fink-Gremmels, J. (2015). Deoxynivalenol Impairs Weight Gain and Affects Markers of Gut Health after Low-Dose, Short-Term Exposure of Growing Pigs. *Toxins*, 7(6), 2071-2095. <https://doi.org/10.3390/toxins7062071>
- Alshannaq, A., & Yu, J.-H. (2017). Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6), 632. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- Amelia, T. S. M., Khalik, W. M. A. W. M., Ong, M. C., Shao, Y. T., Pan, H.-J., & Bhubalan, K. (2021).

Marine microplastics as vectors of major ocean pollutants and its hazards to the marine ecosystem and humans. *Progress in Earth and Planetary Science*, 8(1), 12.
<https://doi.org/10.1186/s40645-020-00405-4>

Andrady, A. L. (2017). The plastic in microplastics : A review. *Marine Pollution Bulletin*, 119(1), 12-22.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.082>

Annesi-Maesano, I., Forastiere, F., Balmes, J., Garcia, E., Harkema, J., Holgate, S., Kelly, F., Khreis, H., Hoffmann, B., Maesano, C. N., McConnell, R., Peden, D., Pinkerton, K., Schikowski, T., Thurston, G., Winkle, L. S. V., & Carlsten, C. (2021). The clear and persistent impact of air pollution on chronic respiratory diseases : A call for interventions. *European Respiratory Journal*, 57(3). <https://doi.org/10.1183/13993003.02981-2020>

Antfolk, M., & Jensen, K. B. (2020). A bioengineering perspective on modelling the intestinal epithelial physiology in vitro. *Nature Communications*, 11(1), 6244.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-20052-z>

Antonissen, G., Van Immerseel, F., Pasmans, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Timbermont, L., Verlinden, M., Janssens, G. P. J., Eeckhaut, V., Eeckhout, M., De Saeger, S., Hessenberger, S., Martel, A., & Croubels, S. (2014). The Mycotoxin Deoxynivalenol Predisposes for the Development of Clostridium perfringens-Induced Necrotic Enteritis in Broiler Chickens. *PLoS ONE*, 9(9), e108775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108775>

Antonissen, G., Van Immerseel, F., Pasmans, F., Ducatelle, R., Janssens, G. P. J., De Baere, S., Mountzouris, K. C., Su, S., Wong, E. A., De Meulenaer, B., Verlinden, M., Devreese, M., Haesebrouck, F., Novak, B., Dohnal, I., Martel, A., & Croubels, S. (2015). Mycotoxins Deoxynivalenol and Fumonisin Alter the Extrinsic Component of Intestinal Barrier in Broiler Chickens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(50), 10846-10855.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04119>

Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2017). Global

patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4), 683-691.

<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912>

Awad, W. A., Ruhnau, D., Hess, C., Doupovec, B., Schatzmayr, D., & Hess, M. (2019). Feeding of deoxynivalenol increases the intestinal paracellular permeability of broiler chickens.

Archives of Toxicology, 93(7), 2057-2064. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02460-3>

Bai, C.-L., Liu, L.-Y., Hu, Y.-B., Zeng, E. Y., & Guo, Y. (2022). Microplastics : A review of analytical methods, occurrence and characteristics in food, and potential toxicities to biota. *Science of The Total Environment*, 806, 150263. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150263>

The Total Environment, 806, 150263. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150263>

Banerjee, A., Billey, L. O., McGarvey, A. M., & Shelver, W. L. (2022). Effects of polystyrene micro/nanoplastics on liver cells based on particle size, surface functionalization, concentration and exposure period. *Science of The Total Environment*, 836, 155621.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155621>

Barichella, M., Severgnini, M., Cilia, R., Cassani, E., Bolliri, C., Caronni, S., Ferri, V., Canello, R., Ceccarani, C., Faierman, S., Pinelli, G., Bellis, G., Zecca, L., Cereda, E., Consolandi, C., & Pezzoli, G. (2018). Unraveling gut microbiota in Parkinson's disease and atypical parkinsonism. *Movement Disorders*, 34(3), 396-405. <https://doi.org/10.1002/mds.27581>

Bartley, A., Yang, T., Arocha, R., Malphurs, W. L., Larkin, R., Magee, K. L., Vickroy, T. W., & Zubcevic, J. (2018). Increased Abundance of Lactobacillales in the Colon of Beta-Adrenergic Receptor Knock Out Mouse Is Associated With Increased Gut Bacterial Production of Short Chain Fatty Acids and Reduced IL17 Expression in Circulating CD4+ Immune Cells. *Frontiers in Physiology*, 9, 1593. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01593>

Bates, J., Vijayakumar, A., Ghoshal, S., Marchand, B., Yi, S., Kornyejev, D., Zagorska, A., Hollenback, D., Walker, K., Liu, K., Pendem, S., Newstrom, D., Brockett, R., Mikaelian, I., Kusam, S., Ramirez, R., Lopez, D., Li, L., Fuchs, B. C., & Breckenridge, D. G. (2020). Acetyl-CoA carboxylase inhibition disrupts metabolic reprogramming during hepatic stellate cell

activation. *Journal of Hepatology*, 73(4), 896-905.

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.037>

Bedossa, P., Patel, K., & Castera, L. (2015). Histologic and noninvasive estimates of liver fibrosis.

Clinical Liver Disease, 6(1), 5-8. <https://doi.org/10.1002/cld.481>

Berkhout, M. D., Plugge, C. M., & Belzer, C. (2021). How microbial glycosyl hydrolase activity in the

gut mucosa initiates microbial cross-feeding. *Glycobiology*, 32(3), 182-200.

<https://doi.org/10.1093/glycob/cwab105>

Berthiller, F., Krska, R., Domig, K. J., Kneifel, W., Juge, N., Schuhmacher, R., & Adam, G. (2011).

Hydrolytic fate of deoxynivalenol-3-glucoside during digestion. *Toxicology Letters*, 206(3),

264-267. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.08.006>

Bocci, V., & Winzler, R. (1969). Metabolism of L-fucose-1-¹⁴C and of fucose glycoproteins in the rat.

American Journal of Physiology-Legacy Content, 216(6), 1337-1342.

<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1969.216.6.1337>

Bonanomi, M., Salmistraro, N., Porro, D., Pinsino, A., Colangelo, A. M., & Gaglio, D. (2022).

Polystyrene micro and nano-particles induce metabolic rewiring in normal human colon

cells : A risk factor for human health. *Chemosphere*, 303, 134947.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134947>

Bracarense, A. P. F. L., Basso, K. M., Da Silva, E. O., Payros, D., & Oswald, I. P. (2017). Deoxynivalenol

in the liver and lymphoid organs of rats : Effects of dose and duration on immunohistological

changes. *World Mycotoxin Journal*, 10(1), 89-96. <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2094>

Bracarense, A. P. F. L., Pierron, A., Pinton, P., Gerez, J. R., Schatzmayr, G., Moll, W.-D., Zhou, T., &

Oswald, I. P. (2020). Reduced toxicity of 3-epi-deoxynivalenol and de-epoxy-deoxynivalenol

through deoxynivalenol bacterial biotransformation : In vivo analysis in piglets. *Food and*

Chemical Toxicology, 140, 111241. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111241>

Bracarense, A.-P. F. L., Luciola, J., Grenier, B., Drociunas Pacheco, G., Moll, W.-D., Schatzmayr, G., &

- Oswald, I. P. (2012). Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. *British Journal of Nutrition*, 107(12), 1776-1786. <https://doi.org/10.1017/S0007114511004946>
- Braun, T., Ehrlich, L., Henrich, W., Koepfel, S., Lomako, I., Schwabl, P., & Liebmann, B. (2021). Detection of Microplastic in Human Placenta and Meconium in a Clinical Setting. *Pharmaceutics*, 13(7), 921. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13070921>
- Britton, G. J., Contijoch, E. J., Mogno, I., Vennaro, O. H., Llewellyn, S. R., Ng, R., Li, Z., Mortha, A., Merad, M., Das, A., Gevers, D., McGovern, D. P. B., Singh, N., Braun, J., Jacobs, J. P., Clemente, J. C., Grinspan, A., Sands, B. E., Colombel, J.-F., ... Faith, J. J. (2019). Microbiotas from Humans with Inflammatory Bowel Disease Alter the Balance of Gut Th17 and ROR γ t+ Regulatory T Cells and Exacerbate Colitis in Mice. *Immunity*, 50(1), 212-224.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.015>
- Campanale, Massarelli, Savino, Locaputo, & Uricchio. (2020). A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4), 1212. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041212>
- Campbell, J., Berry, J., & Liang, Y. (2019). Anatomy and Physiology of the Small Intestine. In *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set* (p. 817-841). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40232-3.00071-6>
- Cano, P. M., Seeboth, J., Meurens, F., Cognie, 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(1), e53647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053647>
- Cao, L., Jiang, Y., Zhu, L., Xu, W., Chu, X., Zhang, Y., Rahman, S. U., Feng, S., Li, Y., Wu, J., & Wang, X.

- (2021). Deoxynivalenol Induces Caspase-8-Mediated Apoptosis through the Mitochondrial Pathway in Hippocampal Nerve Cells of Piglet. *Toxins*, 13(2), 73. <https://doi.org/10.3390/toxins13020073>
- Carreras-Torres, R., Ibáñez-Sanz, G., Obón-Santacana, M., Duell, E. J., & Moreno, V. (2020). Identifying environmental risk factors for inflammatory bowel diseases : A Mendelian randomization study. *Scientific Reports*, 10(1), 19273. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76361-2>
- CE No 1881/2006. (2006). *RÈGLEMENT(CE) No 1881/2006 DE LA COMMISSION du 19 décembre 2006.*
- Center, M. M., Jemal, A., Smith, R. A., & Ward, E. (2009). Worldwide Variations in Colorectal Cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 59(6), 366-378. <https://doi.org/10.3322/caac.20038>
- Chandel, N. S. (2021). Lipid Metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(9), a040576. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040576>
- Chassaing, B., Compher, C., BonHomme, B., Liu, Q., Tian, Y., Walters, W., Nessel, L., Delaroque, C., Hao, F., Gershuni, V., Chau, L., Ni, J., Bewtra, M., Albenberg, L., Bretin, A., McKeever, L., Ley, R. E., Patterson, A. D., Wu, G. D., ... Lewis, J. D. (2022). Randomized Controlled-Feeding Study of Dietary Emulsifier Carboxymethylcellulose Reveals Detrimental Impacts on the Gut Microbiota and Metabolome. *Gastroenterology*, 162(3), 743-756. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.11.006>
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J. K., Poole, A. C., Srinivasan, S., Ley, R. E., & Gewirtz, A. T. (2015). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*, 519(7541), 92-96. <https://doi.org/10.1038/nature14232>
- Chassang, M., & Gautier, A. (2019). *Les maladies chroniques. avis et rapport du conseil économique, social et environnemental.*
- Chen, X., Zhuang, J., Chen, Q., Xu, L., Yue, X., & Qiao, D. (2022a). Chronic exposure to polyvinyl

- chloride microplastics induces liver injury and gut microbiota dysbiosis based on the integration of liver transcriptome profiles and full-length 16S rRNA sequencing data. *Science of The Total Environment*, *839*, 155984. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155984>
- Chen, X., Zhuang, J., Chen, Q., Xu, L., Yue, X., & Qiao, D. (2022b). Polyvinyl chloride microplastics induced gut barrier dysfunction, microbiota dysbiosis and metabolism disorder in adult mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *241*, 113809. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113809>
- Cheng, W., Li, X., Zhou, Y., Yu, H., Xie, Y., Guo, H., Wang, H., Li, Y., Feng, Y., & Wang, Y. (2022). Polystyrene microplastics induce hepatotoxicity and disrupt lipid metabolism in the liver organoids. *Science of The Total Environment*, *806*, 150328. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150328>
- Cheng, W., Zhou, Y., Xie, Y., Li, Y., Zhou, R., Wang, H., Feng, Y., & Wang, Y. (2022). Combined effect of polystyrene microplastics and bisphenol A on the human embryonic stem cells-derived liver organoids: The hepatotoxicity and lipid accumulation. *Science of The Total Environment*, *854*, 158585. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158585>
- Choi, Y. J., Park, J. W., Lim, Y., Seo, S., & Hwang, D. Y. (2021). *In vivo* impact assessment of orally administered polystyrene nanoplastics : Biodistribution, toxicity, and inflammatory response in mice. *Nanotoxicology*, *15*(9), 1180-1198. <https://doi.org/10.1080/17435390.2021.1996650>
- Choudhury, S., Medina-Lara, A., Smith, R., & Daniel, N. (2022). Research on health impacts of chemical contaminants in food. *Bulletin of the World Health Organization*, *100*(03), 180-180A. <https://doi.org/10.2471/BLT.21.287532>
- 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. *Comprehensive Reviews in Food Science*

and *Food Safety*, 19(4), 1449-1464. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12567>

Çobanoğlu, H., Belivermiş, M., Sıkdokur, E., Kılıç, Ö., & Çayır, A. (2021). Genotoxic and cytotoxic effects of polyethylene microplastics on human peripheral blood lymphocytes. *Chemosphere*, 272, 129805. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129805>

Coumoul, X. (2016). Contaminants alimentaires et le risque de cancer. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 51(2), 104-110. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2016.01.006>

Croom, E. (2012). Metabolism of Xenobiotics of Human Environments. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 112, p. 31-88). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415813-9.00003-9>

Dawson, A. L., Kawaguchi, S., King, C. K., Townsend, K. A., King, R., Huston, W. M., & Bengtson Nash, S. M. (2018). Turning microplastics into nanoplastics through digestive fragmentation by Antarctic krill. *Nature Communications*, 9(1), 1001. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03465-9>

Deng, L., Li, G., Peng, S., Wu, J., & Che, Y. (2022). Microplastics in personal care products : Exploring public intention of usage by extending the theory of planned behaviour. *Science of The Total Environment*, 848, 157782. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157782>

Deng, Y., Zhang, Y., Lemos, B., & Ren, H. (2017). Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Scientific Reports*, 7(1), 46687. <https://doi.org/10.1038/srep46687>

Djouina, M., Waxin, C., Leprêtre, F., Tardivel, M., Tillement, O., Vasseur, F., Figeac, M., Bongiovanni, A., Sebda, S., Desreumaux, P., Launay, D., Dubuquoy, L., Body-Malapel, M., & Vignal, C. (2022). Gene/environment interaction in the susceptibility of Crohn's disease patients to aluminum. *Science of The Total Environment*, 850, 158017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158017>

Dooley, J. S., Lok, A. S. F., Burroughs, A. K., & Heathcote, E. J. (Éds.). (2011). Front Matter. In

Sherlock's Diseases of the Liver and Biliary System (p. i-xvi). Wiley-Blackwell.

<https://doi.org/10.1002/9781444341294.fmatter>

Dou, X., Gao, N., Yan, D., & Shan, A. (2020). Sodium Butyrate Alleviates Mouse Colitis by Regulating

Gut Microbiota Dysbiosis. *Animals*, *10*(7), 1154. <https://doi.org/10.3390/ani10071154>

Dourson, M., Ewart, L., Fitzpatrick, S. C., Barros, S. B. M., Mahadevan, B., & Hayes, A. W. (2022). The

Future of Uncertainty Factors With In Vitro Studies Using Human Cells. *Toxicological Sciences*, *186*(1), 12-17. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfab134>

El-Sherif, D. M., Eloffy, M. G., Elmesery, A., Abouzid, M., Gad, M., El-Seedi, H. R., Brinkmann, M.,

Wang, K., & Al Naggar, Y. (2022). Environmental risk, toxicity, and biodegradation of polyethylene : A review. *Environmental Science and Pollution Research International*, *29*(54), 81166-81182. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23382-1>

Fanti, M., Gramignoli, R., Serra, M., Cadoni, E., Strom, S. C., & Marongiu, F. (2017). Differentiation

of amniotic epithelial cells into various liver cell types and potential therapeutic applications. *Placenta*, *59*, 139-145. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.03.020>

Forner, A., Reig, M., & Bruix, J. (2018). Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*, *391*(10127),

1301-1314. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30010-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30010-2)

Fournier, E., Leveque, M., Ruiz, P., Ratel, J., Durif, C., Chalancon, S., Amiard, F., Edely, M., Bezirard,

V., Gaultier, E., Lamas, B., Houdeau, E., Lagarde, F., Engel, E., Etienne-Mesmin, L., Blanquet-Diot, S., & Mercier-Bonin, M. (2022). Microplastics : What happens in the human digestive tract? First evidences in adults using in vitro gut models. *Journal of Hazardous Materials*, *442*, 130010. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130010>

Fournier, E., Ratel, J., Denis, S., Leveque, M., Ruiz, P., Mazal, C., Amiard, F., Edely, M., Bezirard, V.,

Gaultier, E., Lamas, B., Houdeau, E., Engel, E., Lagarde, F., Etienne-Mesmin, L., Mercier-Bonin, M., & Blanquet-Diot, S. (2022). Exposure to polyethylene microplastics alters immature gut microbiome in an infant in vitro gut model. *Journal of Hazardous Materials*,

443, 130383. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130383>

Fraile, J. M., Palliyil, S., Barelle, C. J., Porter, A. J., & Kovaleva, M. (2021). Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) – A Review of a Crowded Clinical Landscape, Driven by a Complex Disease. *Drug Design, Development and Therapy, Volume 15*, 3997-4009. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S315724>

Fu, Y., Yin, S., Zhao, C., Fan, L., & Hu, H. (2022). Combined toxicity of food-borne mycotoxins and heavy metals or pesticides. *Toxicon, 217*, 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.08.012>

Gan, F., Lin, Z., Tang, J., Chen, X., & Huang, K. (2023). Deoxynivalenol at No-Observed Adverse-Effect Levels Aggravates DSS-Induced Colitis through the JAK2/STAT3 Signaling Pathway in Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 71(9)*, 4144-4152. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c00252>

Garber, J. M., Hennet, T., & Szymanski, C. M. (2021a). Significance of fucose in intestinal health and disease. *Molecular Microbiology, 115(6)*, 1086-1093. <https://doi.org/10.1111/mmi.14681>

Garber, J. M., Hennet, T., & Szymanski, C. M. (2021b). Significance of fucose in intestinal health and disease. *Molecular Microbiology, 115(6)*, 1086-1093. <https://doi.org/10.1111/mmi.14681>

Garcia, M. M., Romero, A. S., Merkley, S. D., Meyer-Hagen, J. L., Forbes, C., Hayek, E. E., Scieszka, D. P., Templeton, R., Gonzalez-Estrella, J., Jin, Y., Gu, H., Benavidez, A., Hunter, R. P., Lucas, S., Herbert, G., Kim, K. J., Cui, J. Y., Gullapalli, R., In, J. G., ... Castillo, E. F. (2023). *In Vivo Tissue Distribution of Microplastics and Systemic Metabolomic Alterations After Gastrointestinal Exposure* [Preprint]. *Pharmacology and Toxicology*. <https://doi.org/10.1101/2023.06.02.542598>

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. *Science of The Total Environment, 820*, 153280.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153280>

- Garza-Hernandez, D., Sepulveda-Villegas, M., Garcia-Pelaez, J., Aguirre-Gamboa, R., Lakatos, P. L., Estrada, K., Martinez-Vazquez, M., & Trevino, V. (2022). A systematic review and functional bioinformatics analysis of genes associated with Crohn's disease identify more than 120 related genes. *BMC Genomics*, *23*(1), 302. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08491-y>
- Geller, L. T., Barzily-Rokni, M., Danino, T., Jonas, O. H., Shental, N., Nejman, D., Gavert, N., Zwang, Y., Cooper, Z. A., Shee, K., Thaiss, C. A., Reuben, A., Livny, J., Avraham, R., Frederick, D. T., Ligorio, M., Chatman, K., Johnston, S. E., Mosher, C. M., ... Straussman, R. (2017). Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science*, *357*(6356), 1156-1160. <https://doi.org/10.1126/science.aah5043>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, *3*(7), e1700782. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
- Ghareeb, K., Awad, W. A., Böhm, J., & Zebeli, Q. (2015). Impacts of the feed contaminant deoxynivalenol on the intestine of monogastric animals : Poultry and swine: Effect of deoxynivalenol on gut health. *Journal of Applied Toxicology*, *35*(4), 327-337. <https://doi.org/10.1002/jat.3083>
- Gkoutselis, G., Rohrbach, S., Harjes, J., Obst, M., Brachmann, A., Horn, M. A., & Rambold, G. (2021). Microplastics accumulate fungal pathogens in terrestrial ecosystems. *Scientific Reports*, *11*(1), 13214. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92405-7>
- Glover, J. S., Ticer, T. D., & Engevik, M. A. (2022). Characterizing the mucin-degrading capacity of the human gut microbiota. *Scientific Reports*, *12*(1), 8456. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11819-z>
- Gopinath, P. M., Twayana, K. S., Ramanan, P., John Thomas, Mukherjee, A., Jenkins, D. F., & Chandrasekaran, N. (2021). Prospects on the nano-plastic particles internalization and induction of cellular response in human keratinocytes. *Particle and Fibre Toxicology*, *18*(1),

35. <https://doi.org/10.1186/s12989-021-00428-9>

- Goyarts, T., Dänicke, S., Valenta, H., & Ueberschär, K.-H. (2007). Carry-over of *Fusarium* toxins (deoxynivalenol and zearalenone) from naturally contaminated wheat to pigs. *Food Additives and Contaminants*, 24(4), 369-380. <https://doi.org/10.1080/02652030600988038>
- Grados, L., Pérot, M., Barbezier, N., Delayre-Orthez, C., Bach, V., Fumery, M., Anton, P. M., & Gay-Quéheillard, J. (2022). How advanced are we on the consequences of oral exposure to food contaminants on the occurrence of chronic non communicable diseases? *Chemosphere*, 303, 135260. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135260>
- Gruber-Dorninger, C., Jenkins, T., & Schatzmayr, G. (2019). Global Mycotoxin Occurrence in Feed : A Ten-Year Survey. *Toxins*, 11(7), 375. <https://doi.org/10.3390/toxins11070375>
- Guo, X., Cheng, C., Chen, L., Cao, C., Li, D., Fan, R., & Wei, X. (2023). Metabolomic characteristics in human CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells exposed to polystyrene nanoplastics. *Food and Chemical Toxicology*, 177, 113817. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113817>
- Habibi, N., Uddin, S., Fowler, S. W., & Behbehani, M. (2022). Microplastics in the atmosphere : A review. *Journal of Environmental Exposure Assessment*. <https://doi.org/10.20517/jeea.2021.07>
- Hall, J. E. (2015). *Pocket Companion to Guyton & Hall Textbook of Medical Physiology E-Book : Pocket Companion to Guyton & Hall Textbook of Medical Physiology E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Hanyu, H., Yokoi, Y., Nakamura, K., Ayabe, T., Tanaka, K., Uno, K., Miyajima, K., Saito, Y., Iwatsuki, K., Shimizu, M., Tadaishi, M., & Kobayashi-Hattori, K. (2020). Mycotoxin Deoxynivalenol Has Different Impacts on Intestinal Barrier and Stem Cells by Its Route of Exposure. *Toxins*, 12(10), 610. <https://doi.org/10.3390/toxins12100610>
- He, Y., Li, Z., Xu, T., Luo, D., Chi, Q., Zhang, Y., & Li, S. (2022). Polystyrene nanoplastics deteriorate LPS-modulated duodenal permeability and inflammation in mice via ROS driven-NF-

κB/NLRP3 pathway. *Chemosphere*, 307, 135662.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135662>

Heindel, J. J., Skalla, L. A., Joubert, B. R., Dilworth, C. H., & Gray, K. A. (2017). Review of developmental origins of health and disease publications in environmental epidemiology.

Reproductive Toxicology, 68, 34-48. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.11.011>

Hirt, N., & Body-Malapel, M. (2020). Immunotoxicity and intestinal effects of nano- and microplastics: A review of the literature. *Particle and Fibre Toxicology*, 17(1).

<https://doi.org/10.1186/s12989-020-00387-7>

Horvatits, T., Tamminga, M., Liu, B., Sebode, M., Carambia, A., Fischer, L., Püschel, K., Huber, S., & Fischer, E. K. (2022). Microplastics detected in cirrhotic liver tissue. *eBioMedicine*, 82,

104147. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104147>

Huang, H., Wei, F., Qiu, S., Xing, B., & Hou, J. (2023). Polystyrene microplastics trigger adiposity in mice by remodeling gut microbiota and boosting fatty acid synthesis. *Science of The Total Environment*, 890, 164297. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164297>

Huang, S., Huang, X., Bi, R., Guo, Q., Yu, X., Zeng, Q., Huang, Z., Liu, T., Wu, H., Chen, Y., Xu, J., Wu, Y., & Guo, P. (2022). Detection and Analysis of Microplastics in Human Sputum.

Environmental Science & Technology, 56(4), 2476-2486.

<https://doi.org/10.1021/acs.est.1c03859>

Huang, W., Yin, H., Yang, Y., Jin, L., Lu, G., & Dang, Z. (2021). Influence of the co-exposure of microplastics and tetrabromobisphenol A on human gut : Simulation in vitro with human cell

Caco-2 and gut microbiota. *Science of The Total Environment*, 778, 146264.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146264>

Hussain, M. (2016). Food Contamination : Major Challenges of the Future. *Foods*, 5(4), 21.

<https://doi.org/10.3390/foods5020021>

Ibrahim, Y. S., Tuan Anuar, S., Azmi, A. A., Wan Mohd Khalik, W. M. A., Lehata, S., Hamzah, S. R.,

- Ismail, D., Ma, Z. F., Dzulkarnaen, A., Zakaria, Z., Mustafa, N., Tuan Sharif, S. E., & Lee, Y. Y. (2021). Detection of microplastics in human colectomy specimens. *JGH Open*, *5*(1), 116-121. <https://doi.org/10.1002/jgh3.12457>
- Im, C., Kim, H., Zaheer, J., Kim, J. Y., Lee, Y.-J., Kang, C. M., & Kim, J. S. (2022). PET Tracing of Biodistribution for Orally Administered ⁶⁴Cu-Labeled Polystyrene in Mice. *Journal of Nuclear Medicine*, *63*(3), 461-467. <https://doi.org/10.2967/jnumed.120.256982>
- Imperiale, T. F., Gruber, R. N., Stump, T. E., Emmett, T. W., & Monahan, P. O. (2019). Performance Characteristics of Fecal Immunochemical Tests for Colorectal Cancer and Advanced Adenomatous Polyps : A Systematic Review and Meta-analysis. *Annals of Internal Medicine*, *170*(5), 319. <https://doi.org/10.7326/M18-2390>
- International Agency for Research on Cancer (Éd.). (1993). *Some naturally occurring substances : Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins: this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 9 - 16 June 1992*. IARC.
- Janik, E., Niemcewicz, M., Ceremuga, M., Stela, M., Saluk-Bijak, J., Siadkowski, A., & Bijak, M. (2020). Molecular Aspects of Mycotoxins—A Serious Problem for Human Health. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(21), 8187. <https://doi.org/10.3390/ijms21218187>
- Jenner, L. C., Rotchell, J. M., Bennett, R. T., Cowen, M., Tentzeris, V., & Sadofsky, L. R. (2022). Detection of microplastics in human lung tissue using μ FTIR spectroscopy. *Science of The Total Environment*, *831*, 154907. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154907>
- Jeon, M. S., Kim, J. W., Han, Y. B., Jeong, M. H., Kim, H. R., Sik Kim, H., Park, Y. J., & Chung, K. H. (2022). Polystyrene microplastic particles induce autophagic cell death in BEAS-2B human bronchial epithelial cells. *Environmental Toxicology*, *38*(2), 359-367. <https://doi.org/10.1002/tox.23705>
- Jia, B., Lin, H., Yu, S., Liu, N., Yu, D., & Wu, A. (2023). Mycotoxin deoxynivalenol-induced intestinal

- flora disorders, dysfunction and organ damage in broilers and pigs. *Journal of Hazardous Materials*, 451, 131172. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131172>
- Jia, R., Han, J., Liu, X., Li, K., Lai, W., Bian, L., Yan, J., & Xi, Z. (2023). Exposure to Polypropylene Microplastics via Oral Ingestion Induces Colonic Apoptosis and Intestinal Barrier Damage through Oxidative Stress and Inflammation in Mice. *Toxics*, 11(2), 127. <https://doi.org/10.3390/toxics11020127>
- Jiang, K., Jiang, Q., Mo, X., Li, J., Hu, H., Huang, Q., Guo, W., Qiu, T., Ren, J., Zhang, L., Xie, Y., & Huang, K. (2020). *Study on the Characteristics of Gut Microbiota in Chronic Hepatitis B Patients with Damp Heat Syndrome and Liver Depression and Spleen Deficiency Syndrome* [Preprint]. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-45025/v1>
- Jin, M.-Y., Wu, X.-Y., Li, M.-Y., Li, X.-T., Huang, R.-M., Sun, Y.-M., & Xu, Z.-L. (2021). Noni (*Morinda citrifolia* L.) Fruit Polysaccharides Regulated IBD Mice Via Targeting Gut Microbiota : Association of JNK/ERK/NF- κ B Signaling Pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(35), 10151-10162. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03833>
- Jin, Y., Lu, L., Tu, W., Luo, T., & Fu, Z. (2019). Impacts of polystyrene microplastic on the gut barrier, microbiota and metabolism of mice. *Science of The Total Environment*, 649, 308-317. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.353>
- Joo, S. H., Liang, Y., Kim, M., Byun, J., & Choi, H. (2021). Microplastics with adsorbed contaminants : Mechanisms and Treatment. *Environmental Challenges*, 3, 100042. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2021.100042>
- Kamle, M., Mahato, D. K., Gupta, A., Pandhi, S., Sharma, B., Dhawan, K., Vasundhara, Mishra, S., Kumar, M., Tripathi, A. D., Rasane, P., Selvakumar, R., Kumar, A., Gamlath, S., & Kumar, P. (2022). Deoxynivalenol : An Overview on Occurrence, Chemistry, Biosynthesis, Health Effects and Its Detection, Management, and Control Strategies in Food and Feed. *Microbiology Research*, 13(2), 292-314. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13020023>

- Kang, D.-W., Adams, J. B., Coleman, D. M., Pollard, E. L., Maldonado, J., McDonough-Means, S., Caporaso, J. G., & Krajmalnik-Brown, R. (2019). Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Scientific Reports*, *9*(1), 5821. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42183-0>
- Karami, A., Golieskardi, A., Ho, Y. B., Larat, V., & Salamatinia, B. (2017). Microplastics in eviscerated flesh and excised organs of dried fish. *Scientific Reports*, *7*(1), 5473. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05828-6>
- Katsara, K., Kenanakis, G., Viskadourakis, Z., & Papadakis, V. M. (2021). Polyethylene Migration from Food Packaging on Cheese Detected by Raman and Infrared (ATR/FT-IR) Spectroscopy. *Materials*, *14*(14), 3872. <https://doi.org/10.3390/ma14143872>
- Ke, J., Li, Y., Han, C., He, R., Lin, R., Qian, W., & Hou, X. (2020). Fucose Ameliorate Intestinal Inflammation Through Modulating the Crosstalk Between Bile Acids and Gut Microbiota in a Chronic Colitis Murine Model. *Inflammatory Bowel Diseases*, *26*(6), 863-873. <https://doi.org/10.1093/ibd/izaa007>
- Khan, I., Ullah, N., Zha, L., Bai, Y., Khan, A., Zhao, T., Che, T., & Zhang, C. (2019). Alteration of Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease (IBD) : Cause or Consequence? IBD Treatment Targeting the Gut Microbiome. *Pathogens*, *8*(3), 126. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030126>
- Knutsen, H. K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L. (Ron), Nebbia, C. S., Oswald, I. P., Petersen, A., Rose, M., Roudot, A., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Vollmer, G., ... Edler, L. (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*(9), e04718. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4718>
- Koelmans, A. A., Mohamed Nor, N. H., Hermsen, E., Kooi, M., Mintenig, S. M., & De France, J. (2019).

- Microplastics in freshwaters and drinking water : Critical review and assessment of data quality. *Water Research*, 155, 410-422. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.02.054>
- Koszucka, A., Nowak, A., Nowak, I., & Motyl, I. (2020). Acrylamide in human diet, its metabolism, toxicity, inactivation and the associated European Union legal regulations in food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(10), 1677-1692. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1588222>
- Kumar, S., Prasad, S., Yadav, K. K., Shrivastava, M., Gupta, N., Nagar, S., Bach, Q.-V., Kamyab, H., Khan, S. A., Yadav, S., & Malav, L. C. (2019). Hazardous heavy metals contamination of vegetables and food chain : Role of sustainable remediation approaches - A review. *Environmental Research*, 179, 108792. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108792>
- Kutralam-Muniasamy, G., Shruti, V. C., Pérez-Guevara, F., & Roy, P. D. (2023). Microplastic diagnostics in humans : “The 3Ps” Progress, problems, and prospects. *Science of The Total Environment*, 856, 159164. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159164>
- Låg, M., Øvrevik, J., Refsnes, M., & Holme, J. A. (2020). Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons in air pollution-induced non-malignant respiratory diseases. *Respiratory Research*, 21(1), 299. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01563-1>
- Langmann, T., & Schmitz, G. (2006). Loss of detoxification in inflammatory bowel disease. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*, 3(7), 358-359. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep0545>
- Le Goff, M. L. (2020). *Etude des vésicules extracellulaires endothéliales et autres marqueurs de toxicité du Benzo[a]pyrène : Influence d'extraits de microalgues d'origine marine.*
- Lebelo, K., Malebo, N., Mochane, M. J., & Masinde, M. (2021). Chemical Contamination Pathways and the Food Safety Implications along the Various Stages of Food Production : A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(11), 5795. <https://doi.org/10.3390/ijerph18115795>

- Lee, C., Hong, S. N., Paik, N. Y., Kim, T. J., Kim, E. R., Chang, D. K., & Kim, Y.-H. (2019). CD1d Modulates Colonic Inflammation in NOD2^{-/-} Mice by Altering the Intestinal Microbial Composition Comprising *Acetatifactor muris*. *Journal of Crohn's and Colitis*, *13*(8), 1081-1091. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjz025>
- Lee, H.-J., Song, N.-S., Kim, J.-S., & Kim, S.-K. (2021). Variation and Uncertainty of Microplastics in Commercial Table Salts : Critical Review and Validation. *Journal of Hazardous Materials*, *402*, 123743. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123743>
- Leino, L., Tall, T., Helander, M., Saloniemi, I., Saikkonen, K., Ruuskanen, S., & Puigbò, P. (2021). Classification of the glyphosate target enzyme (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) for assessing sensitivity of organisms to the herbicide. *Journal of Hazardous Materials*, *408*, 124556. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124556>
- Leslie, H. A., Van Velzen, M. J. M., Brandsma, S. H., Vethaak, A. D., Garcia-Vallejo, J. J., & Lamoree, M. H. (2022). Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment International*, *163*, 107199. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107199>
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The fusarium laboratory manual* (1st ed). Blackwell Pub.
- Li, B., Ding, Y., Cheng, X., Sheng, D., Xu, Z., Rong, Q., Wu, Y., Zhao, H., Ji, X., & Zhang, Y. (2020). Polyethylene microplastics affect the distribution of gut microbiota and inflammation development in mice. *Chemosphere*, *244*, 125492. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125492>
- Li, L., Xu, M., He, C., Wang, H., & Hu, Q. (2022). Polystyrene nanoplastics potentiate the development of hepatic fibrosis in high fat diet fed mice. *Environmental Toxicology*, *37*(2), 362-372. <https://doi.org/10.1002/tox.23404>
- Li, R., Wang, G. P., Whitlock, J. A., Zhao, S., Yagiz, Y., & Gu, L. (2020). Muscadine grapes (*Vitis rotundifolia*) and dealcoholized muscadine wine alleviated symptoms of colitis and protected against dysbiosis in mice exposed to dextran sulfate sodium. *Journal of Functional*

Foods, 65, 103746. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103746>

- Li, S., Ma, Y., Ye, S., Tang, S., Liang, N., Liang, Y., & Xiao, F. (2021). Polystyrene microplastics trigger hepatocyte apoptosis and abnormal glycolytic flux via ROS-driven calcium overload. *Journal of Hazardous Materials*, 417, 126025. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126025>
- Li, X., Mu, P., Wen, J., & Deng, Y. (2017). Carrier-Mediated and Energy-Dependent Uptake and Efflux of Deoxynivalenol in Mammalian Cells. *Scientific Reports*, 7(1), 5889. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06199-8>
- Li, Y., Guo, M., Niu, S., Shang, M., Chang, X., Sun, Z., Zhang, R., Shen, X., & Xue, Y. (2023). ROS and DRP1 interactions accelerate the mitochondrial injury induced by polystyrene nanoplastics in human liver HepG2 cells. *Chemico-Biological Interactions*, 379, 110502. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110502>
- Liang, B., Zhong, Y., Huang, Y., Lin, X., Liu, J., Lin, L., Hu, M., Jiang, J., Dai, M., Wang, B., Zhang, B., Meng, H., Lelaka, J. J. J., Sui, H., Yang, X., & Huang, Z. (2021). Underestimated health risks : Polystyrene micro- and nanoplastics jointly induce intestinal barrier dysfunction by ROS-mediated epithelial cell apoptosis. *Particle and Fibre Toxicology*, 18(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12989-021-00414-1>
- Liu, J., Zhang, L., Xu, F., Meng, S., Li, H., & Song, Y. (2022). Polystyrene Microplastics Postpone APAP-Induced Liver Injury through Impeding Macrophage Polarization. *Toxics*, 10(12), 792. <https://doi.org/10.3390/toxics10120792>
- Liu, K., Li, Q., Andrady, A. L., Wang, X., He, Y., & Li, D. (2024). Underestimated activity-based microplastic intake under scenario-specific exposures. *Environmental Science and Ecotechnology*, 18, 100316. <https://doi.org/10.1016/j.ese.2023.100316>
- Liu, S., Wang, Z., Xiang, Q., Wu, B., Lv, W., & Xu, S. (2022). A comparative study in healthy and diabetic mice followed the exposure of polystyrene microplastics : Differential lipid metabolism and inflammation reaction. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 244,

114031. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114031>

Liu, T.-W., Ho, C.-W., Huang, H.-H., Chang, S.-M., Papat, S. D., Wang, Y.-T., Wu, M.-S., Chen, Y.-J., & Lin, C.-H. (2009). Role for α -L-fucosidase in the control of *Helicobacter pylori*-infected gastric cancer cells.

Lu, L., Wan, Z., Luo, T., Fu, Z., & Jin, Y. (2018). Polystyrene microplastics induce gut microbiota dysbiosis and hepatic lipid metabolism disorder in mice. *Science of The Total Environment*, 631-632, 449-458. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.051>

Luis, A. S., & Hansson, G. C. (2023). Intestinal mucus and their glycans : A habitat for thriving microbiota. *Cell Host & Microbe*, 31(7), 1087-1100. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.05.026>

Luo, S., Terciolo, 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. *Environment International*, 132, 105082. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105082>

Luo, T., Wang, D., Zhao, Y., Li, X., Yang, G., & Jin, Y. (2022). Polystyrene microplastics exacerbate experimental colitis in mice tightly associated with the occurrence of hepatic inflammation. *Science of The Total Environment*, 844, 156884. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156884>

Luo, T., Zhang, Y., Wang, C., Wang, X., Zhou, J., Shen, M., Zhao, Y., Fu, Z., & Jin, Y. (2019). Maternal exposure to different sizes of polystyrene microplastics during gestation causes metabolic disorders in their offspring. *Environmental Pollution*, 255, 113122. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113122>

Luqman, A., Nugrahapraja, H., Wahyuono, R. A., Islami, I., Haekal, M. H., Fardiansyah, Y., Putri, B. Q., Amalludin, F. I., Rofiq, E. A., Götz, F., & Wibowo, A. T. (2021). Microplastic Contamination in Human Stools, Foods, and Drinking Water Associated with Indonesian

Coastal Population. *Environments*, 8(12), 138.

<https://doi.org/10.3390/environments8120138>

Mahato, D. K., Pandhi, S., Kamle, M., Gupta, A., Sharma, B., Panda, B. K., Srivastava, S., Kumar, M., Selvakumar, R., Pandey, A. K., Suthar, P., Arora, S., Kumar, A., Gamlath, S., Bharti, A., & Kumar, P. (2022). Trichothecenes in food and feed : Occurrence, impact on human health and their detection and management strategies. *Toxicon*, 208, 62-77.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.01.011>

Manda, G., Mocanu, M. A., Marin, D. E., & Taranu, I. (2015). Dual Effects Exerted in Vitro by Micromolar Concentrations of Deoxynivalenol on Undifferentiated Caco-2 Cells. *Toxins*, 7(2), 593-603.

<https://doi.org/10.3390/toxins7020593>

Maresca, M., & Fantini, J. (2010). Some food-associated mycotoxins as potential risk factors in humans predisposed to chronic intestinal inflammatory diseases. *Toxicon*, 56(3), 282-294.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.04.016>

Marques, M. L., & Cairrao, E. (2023). Occurrence and Health Effects of Hexabromocyclododecane : An Updated Review. *Toxics*, 11(5), 409.

<https://doi.org/10.3390/toxics11050409>

Mattioda, V., Benedetti, V., Tessarolo, C., Oberto, F., Favole, A., Gallo, M., Martelli, W., Crescio, M. I., Berio, E., Masoero, L., Benedetto, A., Pezzolato, M., Bozzetta, E., Grattarola, C., Casalone, C., Corona, C., & Giorda, F. (2023). Pro-Inflammatory and Cytotoxic Effects of Polystyrene Microplastics on Human and Murine Intestinal Cell Lines. *Biomolecules*, 13(1), 140.

<https://doi.org/10.3390/biom13010140>

Mayer, E. A., Nance, K., & Chen, S. (2022). *The Gut–Brain Axis*.

Meng, K., Lwanga, E. H., Van Der Zee, M., Munhoz, D. R., & Geissen, V. (2023). Fragmentation and depolymerization of microplastics in the earthworm gut : A potential for microplastic bioremediation? *Journal of Hazardous Materials*, 447, 130765.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.130765>

- Mercogliano, R., Avio, C. G., Regoli, F., Anastasio, A., Colavita, G., & Santonicola, S. (2020). Occurrence of Microplastics in Commercial Seafood under the Perspective of the Human Food Chain. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(19), 5296-5301. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01209>
- Mesnager, R., Ibragim, M., Mandrioli, D., Falcioni, L., Tibaldi, E., Belpoggi, F., Brandsma, I., Bourne, E., Savage, E., Mein, C. A., & Antoniou, M. N. (2022). Comparative Toxicogenomics of Glyphosate and Roundup Herbicides by Mammalian Stem Cell-Based Genotoxicity Assays and Molecular Profiling in Sprague-Dawley Rats. *Toxicological Sciences*, *186*(1), 83-101. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfab143>
- Mishra, S., Tripathi, A., Chaudhari, B. P., Dwivedi, P. D., Pandey, H. P., & Das, M. (2014). Deoxynivalenol induced mouse skin cell proliferation and inflammation via MAPK pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *279*(2), 186-197. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.06.003>
- Mohamed Nor, N. H., Kooi, M., Diepens, N. J., & Koelmans, A. A. (2021). Lifetime Accumulation of Microplastic in Children and Adults. *Environmental Science & Technology*, *55*(8), 5084-5096. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07384>
- Morais, L. H., Schreiber, H. L., & Mazmanian, S. K. (2021). The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(4), 241-255. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00460-0>
- Mörbe, U. M., Jørgensen, P. B., Fenton, T. M., Von Burg, N., Riis, L. B., Spencer, J., & Agace, W. W. (2021). Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunology*, *14*(4), 793-802. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00389-4>
- Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, *14*(10), 667-685. <https://doi.org/10.1038/nri3738>
- Mu, Y., Sun, J., Li, Z., Zhang, W., Liu, Z., Li, C., Peng, C., Cui, G., Shao, H., & Du, Z. (2022). Activation

of pyroptosis and ferroptosis is involved in the hepatotoxicity induced by polystyrene microplastics in mice. *Chemosphere*, 291, 132944. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132944>

Murray, E., Cheng, X., Krishna, A., Jin, X., Ohara, T. E., Stappenbeck, T. S., & Bose, R. (2021). HER2 and APC Mutations Promote Altered Crypt-Villus Morphology and Marked Hyperplasia in the Intestinal Epithelium. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 12(3), 1105-1120. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.04.012>

Nagamine, C. M., Rogers, A. B., Fox, J. G., & Schauer, D. B. (2008). Helicobacter hepaticus promotes azoxymethane-initiated colon tumorigenesis in BALB/c-IL10-deficient mice. *International Journal of Cancer*, 122(4), 832-838. <https://doi.org/10.1002/ijc.23175>

Nail, A. N., Spear, B. T., & Peterson, M. L. (2021). Highly homologous mouse Cyp2a4 and Cyp2a5 genes are differentially expressed in the liver and both express long non-coding antisense RNAs. *Gene*, 767, 145162. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145162>

Napper, I. E., & Thompson, R. C. (2020). Plastic Debris in the Marine Environment : History and Future Challenges. *Global Challenges*, 4(6), 1900081. <https://doi.org/10.1002/gch2.201900081>

Neurath, M. F. (2019). Targeting immune cell circuits and trafficking in inflammatory bowel disease. *Nature Immunology*, 20(8), 970-979. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0415-0>

Okamura, T., Hamaguchi, M., Hasegawa, Y., Hashimoto, Y., Majima, S., Senmaru, T., Ushigome, E., Nakanishi, N., Asano, M., Yamazaki, M., Sasano, R., Nakanishi, Y., Seno, H., Takano, H., & Fukui, M. (2023). Oral Exposure to Polystyrene Microplastics of Mice on a Normal or High-Fat Diet and Intestinal and Metabolic Outcomes. *Environmental Health Perspectives*, 131(2), 027006. <https://doi.org/10.1289/EHP11072>

Oliveri Conti, G., Ferrante, M., Banni, M., Favara, C., Nicolosi, I., Cristaldi, A., Fiore, M., & Zuccarello, P. (2020). Micro- and nano-plastics in edible fruit and vegetables. The first diet risks

assessment for the general population. *Environmental Research*, 187, 109677.

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109677>

Osselaere, A., Devreese, M., Goossens, J., Vandenbroucke, V., De Baere, S., De Backer, P., & Croubels, S. (2013). Toxicokinetic study and absolute oral bioavailability of deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone in broiler chickens. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 350-355. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.10.006>

Pan, X., Whitten, D. A., Wilkerson, C. G., & Pestka, J. J. (2014). Dynamic Changes in Ribosome-Associated Proteome and Phosphoproteome During Deoxynivalenol-Induced Translation Inhibition and Ribotoxic Stress. *Toxicological Sciences*, 138(1), 217-233. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft270>

Paulick, M., Winkler, J., Kersten, S., Schatzmayr, D., Schwartz-Zimmermann, H., & Dänicke, S. (2015). Studies on the Bioavailability of Deoxynivalenol (DON) and DON Sulfonate (DONS) 1, 2, and 3 in Pigs Fed with Sodium Sulfite-Treated DON-Contaminated Maize. *Toxins*, 7(11), 4622-4644. <https://doi.org/10.3390/toxins7114622>

Payros, D., Alassane-Kpembi, I., Pierron, A., Loiseau, N., Pinton, P., & Oswald, I. P. (2016). Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms. *Archives of Toxicology*, 90(12), 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(2), e00007-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00007-17>

Payros, D., Ménard, 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. *Archives of Toxicology*, 94(9), 3173-3184. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02817-z>

- Pedrotti, M. L., Lombard, F., Baudena, A., Galgani, F., Elineau, A., Petit, S., Henry, M., Troublé, R., Reverdin, G., Ser-Giacomi, E., Kedzierski, M., Boss, E., & Gorsky, G. (2022). An integrative assessment of the plastic debris load in the Mediterranean Sea. *Science of The Total Environment*, *838*, 155958. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155958>
- Pestka, J., Clark, E., Schwartz-Zimmermann, H., & Berthiller, F. (2017). Sex Is a Determinant for Deoxynivalenol Metabolism and Elimination in the Mouse. *Toxins*, *9*(8), 240. <https://doi.org/10.3390/toxins9080240>
- Pestka, J. J., Islam, Z., & Amuzie, C. J. (2008). Immunochemical assessment of deoxynivalenol tissue distribution following oral exposure in the mouse. *Toxicology Letters*, *178*(2), 83-87. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.02.005>
- Pfeiffer, N., Desmarchelier, C., Blaut, M., Daniel, H., Haller, D., & Clavel, T. (2012). Acetatifactor muris gen. Nov., sp. Nov., a novel bacterium isolated from the intestine of an obese mouse. *Archives of Microbiology*, *194*(11), 901-907. <https://doi.org/10.1007/s00203-012-0822-1>
- Pickard, J. M., & Chervonsky, A. V. (2015). Intestinal Fucose as a Mediator of Host–Microbe Symbiosis. *The Journal of Immunology*, *194*(12), 5588-5593. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500395>
- Pickard, J. M., Maurice, C. F., Kinnebrew, M. A., Abt, M. C., Schenten, D., Golovkina, T. V., Bogatyrev, S. R., Ismagilov, R. F., Pamer, E. G., Turnbaugh, P. J., & Chervonsky, A. V. (2014). Rapid fucosylation of intestinal epithelium sustains host–commensal symbiosis in sickness. *Nature*, *514*(7524), 638-641. <https://doi.org/10.1038/nature13823>
- Pinto, A. C. S. M., De Pierri, C. R., Evangelista, A. G., Gomes, A. S. D. L. P. B., & Luciano, F. B. (2022). Deoxynivalenol : Toxicology, Degradation by Bacteria, and Phylogenetic Analysis. *Toxins*, *14*(2), 90. <https://doi.org/10.3390/toxins14020090>
- Pinton, P., Nougayrède, J.-P., Del Rio, J.-C., Moreno, C., Marin, D. E., Ferrier, L., Bracarense, A.-P., Kolf-Clauw, M., & Oswald, I. P. (2009). The food contaminant deoxynivalenol, decreases

- intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 237(1), 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.003>
- Pinton, P., Tsybulskyy, D., Lucioli, J., Laffitte, J., Callu, P., Lyazhri, F., Grosjean, F., Bracarense, A. P., Kolf-Clauw, M., & Oswald, I. P. (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(1), 180-190. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs239>
- Pironti, C., Notarstefano, V., Ricciardi, M., Motta, O., Giorgini, E., & Montano, L. (2022). First Evidence of Microplastics in Human Urine, a Preliminary Study of Intake in the Human Body. *Toxics*, 11(1), 40. <https://doi.org/10.3390/toxics11010040>
- Pivokonsky, M., Cermakova, L., Novotna, K., Peer, P., Cajthaml, T., & Janda, V. (2018). Occurrence of microplastics in raw and treated drinking water. *Science of The Total Environment*, 643, 1644-1651. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.102>
- Plastics Europe_Plastics—The Facts 2022. (s. d.). *Plastics Europe*. Consulté 26 juillet 2023, à l'adresse <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/>
- Pletz, M. (2022). Ingested microplastics : Do humans eat one credit card per week? *Journal of Hazardous Materials Letters*, 3, 100071. <https://doi.org/10.1016/j.hazl.2022.100071>
- Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., Krska, R., Kuchler, K., Glössl, J., Luschnig, C., & Adam, G. (2003). Detoxification of the Fusarium Mycotoxin Deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 47905-47914. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307552200>
- Pöschl, F., Höher, T., Pirklbauer, S., Wolinski, H., Lienhart, L., Ressler, M., & Riederer, M. (2023). Dose and route dependent effects of the mycotoxin deoxynivalenol in a 3D gut-on-a-chip model with flow. *Toxicology in Vitro*, 88, 105563. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2023.105563>
- Prasad, C., Davis, K. E., Imrhan, V., Juma, S., & Vijayagopal, P. (2019). Advanced Glycation End

Products and Risks for Chronic Diseases : Intervening Through Lifestyle Modification. *American Journal of Lifestyle Medicine*, 13(4), 384-404.
<https://doi.org/10.1177/1559827617708991>

Przybylska-Gornowicz, B., Tarasiuk, M., Lewczuk, B., Prusik, M., Ziółkowska, N., Zielonka, Ł., Gajęcki, M., & Gajęcka, M. (2015). The Effects of Low Doses of Two Fusarium Toxins, Zearalenone and Deoxynivalenol, on the Pig Jejunum. A Light and Electron Microscopic Study. *Toxins*, 7(11), 4684-4705. <https://doi.org/10.3390/toxins7114684>

Puche, J. E., Saiman, Y., & Friedman, S. L. (2013). Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrosis. *Comprehensive Physiology*, 3.

Qiu, X., Qi, Z., Ouyang, Z., Liu, P., & Guo, X. (2022). Interactions between microplastics and microorganisms in the environment : Modes of action and influencing factors. *Gondwana Research*, 108, 102-119. <https://doi.org/10.1016/j.gr.2021.07.029>

Ralser, A., Dietl, A., Jarosch, S., Engelsberger, V., Wanisch, A., Janssen, K. P., Vieth, M., Quante, M., Haller, D., Busch, D., Deng, L., Mejías-Luque, R., & Gerhard, M. (2022). *Helicobacter pylori* promotes colorectal carcinogenesis by deregulating intestinal immunity and inducing a mucus-degrading microbiota signature. <https://doi.org/10.1101/2022.06.16.22276474>

Rapport de l'AFSSA. (2019). *Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale*. Agence française de sécurité sanitaire des aliments.

Rather, I. A., Koh, W. Y., Paek, W. K., & Lim, J. (2017). The Sources of Chemical Contaminants in Food and Their Health Implications. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 830.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00830>

Rawle, D. J., Dumenil, T., Tang, B., Bishop, C. R., Yan, K., Le, T. T., & Suhrbier, A. (2022). Microplastic consumption induces inflammatory signatures in the colon and prolongs a viral arthritis. *Science of The Total Environment*, 809, 152212.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152212>

- Rebersek, M. (2021). Gut microbiome and its role in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 21(1), 1325. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-09054-2>
- Rochman, C. M., Cook, A.-M., & Koelmans, A. A. (2016). Plastic debris and policy : Using current scientific understanding to invoke positive change: Plastic debris and policy. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(7), 1617-1626. <https://doi.org/10.1002/etc.3408>
- Rochman, C. M., Tahir, A., Williams, S. L., Baxa, D. V., Lam, R., Miller, J. T., Teh, F.-C., Werorilangi, S., & Teh, S. J. (2015). Anthropogenic debris in seafood : Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. *Scientific Reports*, 5(1), 14340. <https://doi.org/10.1038/srep14340>
- Rotchell, J. M., Jenner, L. C., Chapman, E., Bennett, R. T., Bolanle, I. O., Loubani, M., Sadofsky, L., & Palmer, T. M. (2023). Detection of microplastics in human saphenous vein tissue using μ FTIR : A pilot study. *PLOS ONE*, 18(2), e0280594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280594>
- Rubio-Armendáriz, C., Alejandro-Vega, S., Paz-Montelongo, S., Gutiérrez-Fernández, Á. J., Carrascosa-Iruzubieta, C. J., & Hardisson-de La Torre, A. (2022). Microplastics as Emerging Food Contaminants : A Challenge for Food Safety. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(3), 1174. <https://doi.org/10.3390/ijerph19031174>
- Saenen, N. D., Witters, M. S., Hantoro, I., Tejeda, I., Ethirajan, A., Van Belleghem, F., & Smeets, K. (2023). Polystyrene Microplastics of Varying Sizes and Shapes Induce Distinct Redox and Mitochondrial Stress Responses in a Caco-2 Monolayer. *Antioxidants*, 12(3), 739. <https://doi.org/10.3390/antiox12030739>
- Saint-Cyr, M., Perrin-Guyomard, A., Manceau, J., Houée, P., Delmas, J.-M., Rolland, J.-G., & Laurentie, M. (2015). Risk Assessment of Deoxynivalenol by Revisiting Its Bioavailability in Pig and Rat Models to Establish Which Is More Suitable. *Toxins*, 7(12), 5167-5181. <https://doi.org/10.3390/toxins7124873>

- Sarma, D. K., Dubey, R., Samarth, R. M., Shubham, S., Chowdhury, P., Kumawat, M., Verma, V., Tiwari, R. R., & Kumar, M. (2022). The Biological Effects of Polystyrene Nanoplastics on Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Nanomaterials*, 12(10), 1632. <https://doi.org/10.3390/nano12101632>
- Scanlon, V. C., & Sanders, T. (2018). *Essentials of Anatomy and Physiology*. F.A. Davis.
- Schullehner, J., Hansen, B., Thygesen, M., Pedersen, C. B., & Sigsgaard, T. (2018). Nitrate in drinking water and colorectal cancer risk : A nationwide population-based cohort study: Nitrate in drinking water and CRC. *International Journal of Cancer*, 143(1), 73-79. <https://doi.org/10.1002/ijc.31306>
- Schwabl, P., Köppel, S., Königshofer, P., Bucsics, T., Trauner, M., Reiberger, T., & Liebmann, B. (2019). Detection of Various Microplastics in Human Stool : A Prospective Case Series. *Annals of Internal Medicine*, 171(7), 453-457. <https://doi.org/10.7326/M19-0618>
- Senathirajah, K., Attwood, S., Bhagwat, G., Carbery, M., Wilson, S., & Palanisami, T. (2021). Estimation of the mass of microplastics ingested – A pivotal first step towards human health risk assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 404, 124004. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124004>
- Shang, Q., Sun, W., Shan, X., Jiang, H., Cai, C., Hao, J., Li, G., & Yu, G. (2017). Carrageenan-induced colitis is associated with decreased population of anti-inflammatory bacterium, *Akkermansia muciniphila*, in the gut microbiota of C57BL/6J mice. *Toxicology Letters*, 279, 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.904>
- Shankar, A., Dubey, A., Saini, D., Singh, M., Prasad, C. P., Roy, S., Bharati, S. J., Rinki, M., Singh, N., Seth, T., Khanna, M., Sethi, N., Kumar, S., Sirohi, B., Mohan, A., Guleria, R., & Rath, G. K. (2019). Environmental and occupational determinants of lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*, 8(S1), S31-S49. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2019.03.05>
- Shen, R., Yang, K., Cheng, X., Guo, C., Xing, X., Sun, H., Liu, D., Liu, X., & Wang, D. (2022).

Accumulation of polystyrene microplastics induces liver fibrosis by activating cGAS/STING pathway. *Environmental Pollution*, 300, 118986. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118986>

Shruti, V. C., Pérez-Guevara, F., Elizalde-Martínez, I., & Kutralam-Muniasamy, G. (2020). First study of its kind on the microplastic contamination of soft drinks, cold tea and energy drinks— Future research and environmental considerations. *Science of The Total Environment*, 726, 138580. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138580>

Silvio, D., & Claudio, F. (2011). Ulcerative Colitis. *The New England Journal of Medicine*.

Simeoni, U., Bocquet, A., Briend, A., Chouraqui, J.-P., Darmaun, D., Dupont, C., Feillet, F., Frelut, M.-L., Girardet, J.-P., Goulet, O., Hankard, R., Rieu, D., Rozé, J.-C., Turck, D., & Vidailhet, M. (2016). L'origine précoce des maladies chroniques de l'adulte. *Archives de Pédiatrie*, 23(5), 443-446. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2016.01.009>

Singh, S. B., Carroll-Portillo, A., & Lin, H. C. (2023). Desulfovibrio in the Gut : The Enemy within? *Microorganisms*, 11(7), 1772. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071772>

Smith, M.-C., Madec, S., Pawtowski, A., Coton, E., & Hymery, N. (2017). Individual and combined toxicological effects of deoxynivalenol and zearalenone on human hepatocytes in in vitro chronic exposure conditions. *Toxicology Letters*, 280, 238-246. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.08.080>

Song, X., Qiao, L., Chang, J., Dou, X., Zhang, X., Pi, S., & Xu, C. (2022). Dietary supplementation with selenium nanoparticles-enriched Lactobacillus casei ATCC 393 alleviates intestinal barrier dysfunction of mice exposed to deoxynivalenol by regulating endoplasmic reticulum stress and gut microbiota. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 248, 114276. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114276>

Springler, A., Hessenberger, S., Reisinger, N., Kern, C., Nagl, V., Schatzmayr, G., & Mayer, E. (2017). Deoxynivalenol and its metabolite deepoxy-deoxynivalenol : Multi-parameter analysis for

the evaluation of cytotoxicity and cellular effects. *Mycotoxin Research*, 33(1), 25-37.

<https://doi.org/10.1007/s12550-016-0260-z>

Sree, C. G., Buddolla, V., Lakshmi, B. A., & Kim, Y.-J. (2022). Phthalate toxicity mechanisms : An update. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 263, 109498. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109498>

Stock, V., Böhmert, L., Lisicki, E., Block, R., Cara-Carmona, J., Pack, L. K., Selb, R., Lichtenstein, D., Voss, L., Henderson, C. J., Zabinsky, E., Sieg, H., Braeuning, A., & Lampen, A. (2019). Uptake and effects of orally ingested polystyrene microplastic particles in vitro and in vivo. *Archives of Toxicology*, 93(7), 1817-1833. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02478-7>

Sun, C., Li, B., Wang, B., Zhao, J., Zhang, X., Li, T., Li, W., Tang, D., Qiu, M., Wang, X., Zhu, C., & Qian, Z. (2019). The role of *Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer : From carcinogenesis to clinical management. *Chronic Diseases and Translational Medicine*, 5(3), 178-187. <https://doi.org/10.1016/j.cdtm.2019.09.001>

Sun, H., Chen, N., Yang, X., Xia, Y., & Wu, D. (2021). Effects induced by polyethylene microplastics oral exposure on colon mucin release, inflammation, gut microflora composition and metabolism in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 220, 112340. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112340>

Sun, W., Yan, S., Meng, Z., Tian, S., Jia, M., Huang, S., Wang, Y., Zhou, Z., Diao, J., & Zhu, W. (2022). Combined ingestion of polystyrene microplastics and epoxiconazole increases health risk to mice : Based on their synergistic bioaccumulation in vivo. *Environment International*, 166, 107391. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107391>

Swanson, N. L., Leu, A., Abrahamson, J., & Wallet, B. (2014). *Genetically engineered crops, glyphosate and the deterioration of health in the United States of America*.

Tamargo, A., Molinero, N., Reinoso, J. J., Alcolea-Rodriguez, V., Portela, R., Bañares, M. A., Fernández, J. F., & Moreno-Arribas, M. V. (2022). PET microplastics affect human gut

microbiota communities during simulated gastrointestinal digestion, first evidence of plausible polymer biodegradation during human digestion. *Scientific Reports*, 12(1), 528. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04489-w>

Tavakolpournegari, A., Annangi, B., Villacorta, A., Banaei, G., Martin, J., Pastor, S., Marcos, R., & Hernández, A. (2023). Hazard assessment of different-sized polystyrene nanoplastics in hematopoietic human cell lines. *Chemosphere*, 325, 138360. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138360>

Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), 1823-1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>

Tomsik, P., Soukup, T., Cermakova, E., Micuda, S., Niang, M., Sucha, L., & Rezacova, M. (2011). L-rhamnose and L-fucose suppress cancer growth in mice. *Open Life Sciences*, 6(1), 1-9. <https://doi.org/10.2478/s11535-010-0087-0>

Tóth, D. Z. (2007). *Microscopical anatomy of the small and large intestines. Histology the liver, and the pancreas.*

Tran, V. N., Viktorová, J., & Ruml, T. (2020). Mycotoxins : Biotransformation and Bioavailability Assessment Using Caco-2 Cell Monolayer. *Toxins*, 12(10), 628. <https://doi.org/10.3390/toxins12100628>

Tran, V., Viktorova, J., Augustynkova, K., Jelenova, N., Dobiasova, S., Rehorova, K., Fenclova, M., Stranska-Zachariasova, M., Vitek, L., Hajslova, J., & Ruml, T. (2020). In Silico and In Vitro Studies of Mycotoxins and Their Cocktails; Their Toxicity and Its Mitigation by Silibinin Pre-Treatment. *Toxins*, 12(3), 148. <https://doi.org/10.3390/toxins12030148>

Van De Walle, J., Romier, B., Larondelle, Y., & Schneider, Y.-J. (2008). Influence of deoxynivalenol on NF- κ B activation and IL-8 secretion in human intestinal Caco-2 cells. *Toxicology Letters*, 177(3), 205-214. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.01.018>

Van Der Sluis, M., De Koning, B. A. E., De Bruijn, A. C. J. M., Velcich, A., Meijerink, J. P. P., Van

- Goudoever, J. B., Büller, H. A., Dekker, J., Van Seuning, I., Renes, I. B., & Einerhand, A. W. C. (2006). Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. *Gastroenterology*, *131*(1), 117-129. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.04.020>
- Vatzia, Pierron, Saalmüller, Mayer, & Gerner. (2019). Deoxynivalenol Affects Proliferation and Expression of Activation-Related Molecules in Major Porcine T-Cell Subsets. *Toxins*, *11*(11), 644. <https://doi.org/10.3390/toxins11110644>
- Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Yang, K., & Augenlicht, L. (2002). Colorectal Cancer in Mice Genetically Deficient in the Mucin Muc2. *Science*, *295*(5560), 1726-1729. <https://doi.org/10.1126/science.1069094>
- Vidal, A., Claeys, L., Mengelers, M., Vanhoorne, V., Vervaet, C., Huybrechts, B., De Saeger, S., & De Boevre, M. (2018). Humans significantly metabolize and excrete the mycotoxin deoxynivalenol and its modified form deoxynivalenol-3-glucoside within 24 hours. *Scientific Reports*, *8*(1), 5255. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23526-9>
- Vignal, C., Desreumaux, P., & Body-Malapel, M. (2016). Gut : An underestimated target organ for Aluminum. *Morphologie*, *100*(329), 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2016.01.003>
- Vignal, C., Djouina, M., Pichavant, M., Caboche, S., Waxin, C., Beury, D., Hot, D., Gower-Rousseau, C., & Body-Malapel, M. (2018). Chronic ingestion of deoxynivalenol at human dietary levels impairs intestinal homeostasis and gut microbiota in mice. *Archives of Toxicology*, *92*(7), 2327-2338. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2228-6>
- Vitali, C., Peters, R. J. B., Janssen, H.-G., & Nielen, M. W. F. (2022). Microplastics and nanoplastics in food, water, and beverages; part I. occurrence. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *159*, 116670. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116670>
- Wang, H., Zhang, L., Xia, Z., & Cui, J. Y. (2022). Effect of Chronic Cadmium Exposure on Brain and Liver Transporters and Drug-Metabolizing Enzymes in Male and Female Mice Genetically

Predisposed to Alzheimer's Disease. *Drug Metabolism and Disposition*, 50(10), 1414-1428.

<https://doi.org/10.1124/dmd.121.000453>

Wang, J., Liu, X., Li, Y., Powell, T., Wang, X., Wang, G., & Zhang, P. (2019). Microplastics as contaminants in the soil environment : A mini-review. *Science of The Total Environment*, 691, 848-857. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.209>

Wang, Q., Wu, Y., Zhang, W., Shen, T., Li, H., Wu, J., Zhang, L., Qin, L., Chen, R., Gu, W., Sun, Q., Liu, C., & Li, R. (2022). Lipidomics and transcriptomics insight into impacts of microplastics exposure on hepatic lipid metabolism in mice. *Chemosphere*, 308, 136591. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136591>

Wang, S., Chen, L., Shi, X., Wang, Y., & Xu, S. (2023). Polystyrene microplastics-induced macrophage extracellular traps contributes to liver fibrotic injury by activating ROS/TGF- β /Smad2/3 signaling axis. *Environmental Pollution*, 324, 121388. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121388>

Wang, X., Zhang, Y., Zhao, J., Cao, L., Zhu, L., Huang, Y., Chen, X., Rahman, S. U., Feng, S., Li, Y., & Wu, J. (2019). Deoxynivalenol Induces Inflammatory Injury in IPEC-J2 Cells via NF- κ B Signaling Pathway. *Toxins*, 11(12), 733. <https://doi.org/10.3390/toxins11120733>

Wang, Y., Huang, D., Chen, K.-Y., Cui, M., Wang, W., Huang, X., Awadallah, A., Li, Q., Friedman, A., Xin, W. W., Di Martino, L., Cominelli, F., Miron, A., Chan, R., Fox, J., Xu, Y., Shen, X., Kalady, M. F., Markowitz, S., ... Zhou, L. (2017). Fucosylation Deficiency in Mice Leads to Colitis and Adenocarcinoma. *Gastroenterology*, 152(1), 193-205.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.09.004>

Wang, Y., Li, J., Wang, X., Wu, W., Nepovimova, E., Wu, Q., & Kuca, K. (2022). Deoxynivalenol and its modified forms : Key enzymes, inter-individual and interspecies differences in metabolism. *Drug Metabolism Reviews*, 54(3), 331-342. <https://doi.org/10.1080/03602532.2022.2088786>

- Wanner, A., Salathé, M., & O’Riordan, T. G. (1996). Mucociliary clearance in the airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 154(6), 1868-1902.
<https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.6.8970383>
- Wen, S., Zhao, Y., Liu, S., Chen, Y., Yuan, H., & Xu, H. (2022). Polystyrene microplastics exacerbated liver injury from cyclophosphamide in mice : Insight into gut microbiota. *Science of The Total Environment*, 840, 156668. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156668>
- Wibowo, A. T., Nugrahapraja, H., Wahyuono, R. A., Islami, I., Haekal, M. H., Fardiansyah, Y., Sugiyo, P. W. W., Putro, Y. K., Fauzia, F. N., Santoso, H., Götz, F., Tangahu, B. V., & Luqman, A. (2021). Microplastic Contamination in the Human Gastrointestinal Tract and Daily Consumables Associated with an Indonesian Farming Community. *Sustainability*, 13(22), 12840.
<https://doi.org/10.3390/su132212840>
- Wright, S. L., & Kelly, F. J. (2017). Plastic and human health : A micro issue? *Environmental Science*.
- Wu, S., Liu, Y., Duan, Y., Wang, F., Guo, F., Yan, F., Yang, X., & Yang, X. (2018). Intestinal toxicity of deoxynivalenol is limited by supplementation with *Lactobacillus plantarum* JM113 and consequentially altered gut microbiota in broiler chickens. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 9(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0286-5>
- Xie, L., Chen, T., Liu, J., Hou, Y., Tan, Q., Zhang, X., Li, Z., Farooq, T. H., Yan, W., & Li, Y. (2022). Intestinal flora variation reflects the short-term damage of microplastic to the intestinal tract in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 246, 114194.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114194>
- Xue, D., Yang, P., Yang, Y., Wang, Y., Wu, K., Qi, D., & Wang, S. (2022). Deoxynivalenol triggers porcine intestinal tight junction disorder through hijacking SLC5A1 and PGC1 α -mediated mitochondrial function. *Food and Chemical Toxicology*, 163, 112921.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112921>
- Yan, Z., Liu, Y., Zhang, T., Zhang, F., Ren, H., & Zhang, Y. (2022). Analysis of Microplastics in Human

- Feces Reveals a Correlation between Fecal Microplastics and Inflammatory Bowel Disease Status. *Environmental Science & Technology*, 56(1), 414-421.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.1c03924>
- Yang, L., Zhang, Y., Kang, S., Wang, Z., & Wu, C. (2021). Microplastics in soil : A review on methods, occurrence, sources, and potential risk. *Science of The Total Environment*, 780, 146546.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146546>
- Yang, W., Li, Y., & Boraschi, D. (2023). Association between Microorganisms and Microplastics : How Does It Change the Host–Pathogen Interaction and Subsequent Immune Response? *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 4065.
<https://doi.org/10.3390/ijms24044065>
- Yang, X., Jiang, J., Wang, Q., Duan, J., Chen, N., Wu, D., & Xia, Y. (2022). Gender difference in hepatic AMPK pathway activated lipid metabolism induced by aged polystyrene microplastics exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 245, 114105.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114105>
- Yasin, N. A. E., El-Naggar, M. E., Ahmed, Z. S. O., Galal, M. K., Rashad, M. M., Youssef, A. M., & Elleithy, E. M. M. (2022). Exposure to Polystyrene nanoparticles induces liver damage in rat via induction of oxidative stress and hepatocyte apoptosis. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 94, 103911. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103911>
- Younossi, Z., Tacke, F., Arrese, M., Chander Sharma, B., Mostafa, I., Bugianesi, E., Wai-Sun Wong, V., Yilmaz, Y., George, J., Fan, J., & Vos, M. B. (2019). Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*, 69(6), 2672-2682.
<https://doi.org/10.1002/hep.30251>
- Zackular, J. P., Baxter, N. T., Iverson, K. D., Sadler, W. D., Petrosino, J. F., Chen, G. Y., & Schloss, P. D. (2013). The Gut Microbiome Modulates Colon Tumorigenesis. *mBio*, 4(6), e00692-13.
<https://doi.org/10.1128/mBio.00692-13>

- Zaheer, J., Kim, H., Ko, I. O., Jo, E.-K., Choi, E.-J., Lee, H.-J., Shim, I., Woo, H., Choi, J., Kim, G.-H., & Kim, J. S. (2022). Pre/post-natal exposure to microplastic as a potential risk factor for autism spectrum disorder. *Environment International*, *161*, 107121. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107121>
- Zhang, H., Deng, X., Zhou, C., Wu, W., & Zhang, H. (2020). Deoxynivalenol Induces Inflammation in IPEC-J2 Cells by Activating P38 Mapk And Erk1/2. *Toxins*, *12*(3), 180. <https://doi.org/10.3390/toxins12030180>
- Zhang, N., Li, Y. B., He, H. R., Zhang, J. F., & Ma, G. S. (2021). You are what you eat : Microplastics in the feces of young men living in Beijing. *Science of The Total Environment*, *767*, 144345. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144345>
- Zhang, S., Liu, X., Lv, L., Liu, C., Luo, T., Zhu, H., Zhang, J., & Wang, Y. (2023). Combined toxic effects of T-2 toxin and propiconazole on the early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Sciences Europe*, *35*(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s12302-023-00714-7>
- Zhao, L., Shi, W., Hu, F., Song, X., Cheng, Z., & Zhou, J. (2021). Prolonged oral ingestion of microplastics induced inflammation in the liver tissues of C57BL/6J mice through polarization of macrophages and increased infiltration of natural killer cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *227*, 112882. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112882>
- Zheng, D., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research*, *30*(6), 492-506. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>
- Zheng, H., Wang, J., Wei, X., Chang, L., & Liu, S. (2021). Proinflammatory properties and lipid disturbance of polystyrene microplastics in the livers of mice with acute colitis. *Science of The Total Environment*, *750*, 143085. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143085>
- Zhou, H., Guog, T., Dai, H., Yu, Y., Zhang, Y., & Ma, L. (2020). Deoxynivalenol : Toxicological profiles and perspective views for future research. *World Mycotoxin Journal*, *13*(2), 179-188. <https://doi.org/10.3920/WMJ2019.2462>

- Zhou, J., Zhang, S., Lin, H., Gao, C., Yan, H., & Wang, X. (2019). Hydrolyzed wheat gluten alleviates deoxynivalenol-induced intestinal injury by promoting intestinal stem cell proliferation and differentiation via upregulation of Wnt/ β -catenin signaling in mice. *Food and Chemical Toxicology*, *131*, 110579. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110579>
- Zhou, Y., Wang, Y., Quan, M., Zhao, H., & Jia, J. (2021). Gut Microbiota Changes and Their Correlation with Cognitive and Neuropsychiatric Symptoms in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *81*(2), 583-595. <https://doi.org/10.3233/JAD-201497>
- Zou, H., Qu, H., Bian, Y., Sun, J., Wang, T., Ma, Y., Yuan, Y., Gu, J., Bian, J., & Liu, Z. (2023). Polystyrene Microplastics Induce Oxidative Stress in Mouse Hepatocytes in Relation to Their Size. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(8), 7382. <https://doi.org/10.3390/ijms24087382>