

IMPACT DES PRINCIPALES FUSARIOTOXINES, SEULE OU EN ASSOCIATION, SUR LES FONCTIONS TESTICULAIRES DU POULET DE CHAIR

Pascal FROMENT¹, Remy LE GUEVEL², Jean Paul METAYER³, Amandine MIKA⁴,
Jean Denis BAILLY⁵, Philippe GUERRE⁶, Angélique TRAVEL⁴

¹UMR PRC, Centre INRA Val de Loire, 37380 NOUZILLY, France,

²Structure Fédérative de Recherche BIOSIT Université de Rennes 1 F 3504,

³ARVALIS-Institut du Végétal, Station expérimentale, 91720 BOIGNEVILLE, France,

⁴ITAVI, Centre INRA Val de Loire, 37380 NOUZILLY, France,

⁵Université de Toulouse, INP, ENVT, Equipe Biosynthèse et toxicité des mycotoxines, UMR
Toxalim, F-31076 TOULOUSE, France,

⁶Université de Toulouse, INP, ENVT, UR Mycotoxicologie, F-31076 TOULOUSE, France
pascal.froment@inra.fr

RÉSUMÉ

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par certaines moisissures. La présence de ces contaminants dans les aliments destinés aux animaux est un problème majeur, car les mycotoxines peuvent avoir des effets néfastes variés sur leur santé, en impactant notamment certaines fonctions telle que la reproduction. L'objectif de notre démarche est d'évaluer l'impact des principales fusariotoxines, *in vivo* et *in vitro* sur les fonctions testiculaires du poulet de chair. Pour l'essai *in vivo*, 5 groupes de 12 poulets de chair (Ross PM3) ont reçu de la naissance à l'abattage (35 jours d'âge) les aliments suivants : un aliment témoin sain ou un des 4 aliments expérimentalement contaminés avec du déoxynivalénol (DON, 5mg/kg), des fumonisines (FBs, 20 mg/kg), de la zéaralénone (ZEA, 0,5 mg/kg) en contamination unique ou contenant les 3 mycotoxines. Les mycotoxines nécessaires aux expérimentations ont été obtenues par culture de souches fongiques toxigènes. L'analyse de la croissance et l'examen histologique du testicule ont montré que l'activité proliférative du testicule, est augmentée chez les animaux exposés aux FBs, en comparaison du groupe témoin. Par contre, aucune différence sur les marqueurs de mortalité cellulaire (activité caspase 3 et immunomarquage TUNEL), d'inflammation (IL6, IL1 β et IFN γ), ou de stress oxydatif (capacité antioxydante et activité de la catalase) n'a été révélée entre les lots. Des mycotoxines purifiées et diluées dans un solvant (DMSO) ont été testées sur des cultures testiculaires de poulets après 96h d'exposition. Les résultats ont confirmé les données *in vivo* montrant aucun effet à faible dose et un effet négatif des doses élevées (FB1: 100 nM ; ZEA : 30 μ M, DON 1 μ M). En conclusion, *in vitro*, seules des fortes doses peuvent conduire à des lésions testiculaires mais *in vivo* les doses maximales autorisées n'induisent pas d'effet négatif notable sur les testicules de poulets élevés jusqu'à 35j.

ABSTRACT

Impact of mycotoxins, on the testicular functions of broiler chickens.

Mycotoxins are secondary metabolites produced by molds. The presence of these contaminants in animal feed is a major problem because mycotoxins have various adverse effects on health, affecting in particular certain functions such as reproduction. The objective of our approach is to evaluate the impact of the main fusariotoxins, *in vivo* and *in vitro*, on the testicular functions of broiler chickens. For the *in vivo* test, 5 groups of 12 broilers (Ross PM3) received the control or experimentally contaminated diet from hatch to slaughter (35 days of age). The diets were contaminated in: deoxynivalenol (DON, 5 mg / kg), fumonisins (FBs, 20 mg / kg), zearalenone (ZEA, 0.5 mg / kg) in single contamination or containing the 3 mycotoxins. The mycotoxins required for the experiments were obtained by culturing toxigenic fungal strains.

Analysis of the testis growth and histological examination has shown that the proliferative activity of the testis is increased in animals exposed to FBs compared to the control group. On the other hand, no difference was found in markers of cell death (caspase 3 activity and TUNEL immunostaining), of inflammation (IL6, IL1 β and IFN γ), or in oxidative stress (antioxidant capacity and catalase activity). *In vitro* experiments using purified mycotoxins diluted in a solvent (DMSO) were tested on chicken testicular cell cultures after 96 h of exposure. The results confirmed the *in vivo* data showed no effect at low dose. However, high doses (FB1: 100 nM, ZEA: 30 μ M, DON 1 μ M) have an impact on cell viability.

In conclusion, *in vitro*, only high doses can lead to testicular lesions but *in vivo* the maximum concentrations acceptable did not induce any significant effect on the testes of 35 days-old chicken.

INTRODUCTION

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par certaines moisissures et sont présentes au niveau des céréales. Les contaminations d'aliments destinés aux animaux ou à l'Homme est un problème d'actualité, car celles-ci peuvent avoir des effets négatifs sur la santé des animaux et sur la santé humaine. En plus des effets que les mycotoxines peuvent avoir sur les organes tels que le foie, le muscle, les gonades peuvent être également impactées. Ainsi, le testicule qui est le lieu d'une prolifération et d'une différenciation cellulaire active est sensible aux molécules toxiques (Rouiller-Fabre et al., 2014). Lors d'expériences de toxicité à forte dose, réalisées chez le rat et le poulet, il a été montré que le déoxynivalénol (DON) pouvait diminuer la viabilité cellulaire, la prolifération et les interactions entre cellules (Diesing et al., 2011). Une autre étude chez le rat a décrit des lésions testiculaires conduisant à des anomalies morphologiques des cellules germinales (Sprando et al., 2005). Par ailleurs, la zéaralénone, comme le DON conduisent à une réduction du nombre de spermatozoïdes vivants (Yang et al., 2007 ; Kim et al., 2003).

Au cours de cette étude, nous avons réalisé une première analyse sur des cellules testiculaire de poulet *in vitro*, puis nous avons évalué les conséquences au niveau testiculaire d'une ingestion chronique de mycotoxines (exposition prolongée à de faibles doses). Plusieurs biomarqueurs de l'atteinte des fonctions testiculaires ont été mesurés tels que la mort cellulaire, la prolifération, la maturation, le stress oxydatif, la production de testostérone et l'atteinte au niveau des cellules germinales (Lambrot et al., 2006 ; Guibert et al., 2013).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Culture de tissu testiculaire (tubes séminifères)

Nous avons réalisé une culture de tubes séminifères de poulets âgés de 6 semaines (gonades encore immatures) mis en culture pendant 96 h en présence de doses croissantes de mycotoxines : zéaralénone (ZEA) de 0.3 μ M à 30 μ M ; fumonisine B1 (FUMO) de 10 nM à 1 μ M ; et de deoxynivalénol (DON) de 0.1 μ M à 10 μ M. La méthode de culture a été adaptée des méthodologies développées chez les rongeurs (Foster, 1984; Gray, 1984; Staub et al., 2000). Les 3 mycotoxines purifiées proviennent de chez Sigma-Aldrich et ont été resuspendues dans un solvant. - de la FumonisinB1 (FUMO) (100 nM = 72,183 ng/ml). In vivo, « après gavage de poules pondeuses avec des doses de 2,0 mg/kg. D'après Depoire AG 2005, la concentration plasmatique maximale est de 28 à 103 ng/ml (. - de la zéaralénone (ZEA) (100nM = 9,6 ng/ml). In vivo, une administration a 0.30 mg / kg poids corporel

conduit à des teneurs plasmatiques de 1-100 ng/ml chez le poulet (De Baere et al., 2012)

- de la déoxynivalénol (DON) (10nM = 2,9632 ng/ml). In vivo, une administration de 5 mg kg⁻¹ DON, conduit à des concentrations plasmatiques chez le poulet de (DON) 1-4ng/ml (Broekaert et al., 2014 ; Ebrahim et al., 2014)

1.2. Animaux et aliments

Cinq groupes de poulets de souche Ross PM3 ont reçu 4 aliments expérimentaux (contenant soit 5 mg/kg de DON, soit 20 mg/kg de fumonisines (FUMO), soit 0,5 mg/kg de zéaralénone (ZEA), ou un aliment contenant simultanément les 3 mycotoxines) et un aliment exempt de mycotoxines. Les poulets ont eu accès à cette alimentation de 0 à 35 jours d'âge. L'aliment a été contaminé à l'aide de mycotoxines produites sur maïs à l'ENVIT (Jean Denis Bailly), et incorporées sous forme de poudre à l'aliment afin d'obtenir les concentrations choisies.

1.2. Prélèvements et préparation des échantillons testiculaires

A la fin de l'exposition, les animaux sont euthanasiés à l'aide d'un électrocuteur assommoir et saignés. Les testicules ont été prélevés et pesés immédiatement. Puis un testicule a été fixé dans du Bouin pour des analyses histologiques, alors que l'autre testicule a été congelé immédiatement et stocké à -80°C. Le testicule congelé a été broyé dans 500 μ l de tampon phosphate (PBS, Phosphate buffered saline), à l'aide d'un ultraturax. La quantité de protéines du lysat testiculaire a été mesurée par la méthode de Lowry pour permettre de normaliser les dosages décrits ci-après.

1.3. Dosage ELISA

Les dosages par ELISA des protéines PCNA, proliferating cell nuclear antigen (CusaBio, sensibilité 0.78 ng/ml) et DAZL, Deleted in azoospermia-like (CusaBio, sensibilité 3.9 pg/ml, CV intra-assay CV%<8%, inter-assay CV%<10%) permettent d'évaluer la quantité de cellules qui prolifèrent et le nombre de cellules germinales primordiales, respectivement. L'analyse de la mortalité cellulaire a été réalisé à l'aide du marqueur de l'activité caspase 3 (Proméga) et la prolifération cellulaire a été analysée à l'aide de l'incorporation de BrDU suivi d'un marquage immunohistologique.

1.4. Analyses statistiques

Les moyennes +/- SEM ont été comparées par le test d'analyse de variance ANOVA.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1- Analyse *in vitro* d'une exposition des cellules testiculaires par des mycotoxines

Dans un premier temps, nous avons souhaité déterminer les conséquences d'une exposition des cellules testiculaires *in vitro* à des mycotoxines afin de déterminer les effets potentiels.

La structure des tubes séminifères en culture a été analysée à l'aide d'un marquage des filaments d'actine. A partir de la dose de 30µM de ZEA, de 1µM de FUMO et 10µM DON, une désorganisation du réseau cellulaire associée à une rétraction du tapis Sertolien a pu être observée. (Figure 1).

Cette désorganisation nette pour une exposition forte au DON et ZEA est associée à une baisse de la prolifération des cellules (mesurée par incorporation de BrDU), ainsi qu'à une augmentation de l'activité de la caspase 3 clivée qui est associé à la mort cellulaire (Figure 2).

2.2- Poids testiculaire et analyse histologique

Dans un deuxième temps, nous avons effectué des mesures sur les testicules de poulets qui ont été exposés à l'alimentant contaminé expérimentalement de 0 à 35 jours d'âge. Le poids moyen du testicule n'est pas affecté par les 4 aliments expérimentaux. Toutefois, en présence de FUMO le diamètre moyen des tubes séminifères est légèrement supérieur par rapport aux autres lots d'alimentation (Figure 3). A l'inverse, l'exposition avec les 3 mycotoxines conduit à une diminution du diamètre des tubes séminifères par comparaison avec le lot témoin (contrôle : $54,37 \pm 0,68\mu\text{m}$ vs DON+ZEA+FUMO : $44,82 \pm 0,73\mu\text{m}$; $p \leq 0.001$). L'analyse histologique n'a pas montré d'autre différence entre les 5 groupes de traitement.

2.3- Prolifération

Le dosage du marqueur de la prolifération (PCNA) est augmenté d'environ 4 fois en présence de FUMO ($p \leq 0.001$) et le marqueur de cellules germinales (DAZL) est augmenté de 30 fois ($p \leq 0.01$). Ces résultats semblent être contradictoires avec les données obtenus *in vitro*. Toutefois, la FUMO purifiée et administrée directement sur les cellules testiculaires peut conduire à un effet différent de ceux observé *in vivo* (dose plus faible, et production de métabolites secondaires *in vivo* possible).

Il est intéressant de préciser que sur des cellules hépatiques de rat, cellules du canal biliaires de poulet (après 41 jours d'exposition FUMO à 50 mg/kg soit 2,5X la dose utilisée dans notre étude) (Tessari et al., 2006), la mycotoxine FUMO présente des propriétés prolifératives (Figure 4).

L'analyse de la mortalité cellulaire à l'aide du marqueur de l'activité caspase 3 n'a pas montré de différence entre les lots traités et le lot témoin suggérant que les mycotoxines n'induisent pas de mortalité cellulaire.

L'analyse d'une autre activité du testicule importante qui est la production de stéroïdes n'a pas montré que les concentrations intra testiculaire en testostérone étaient affectées par les mycotoxines.

CONCLUSION

Les résultats décrits ci-dessus suggèrent que l'utilisation de mycotoxines purifiées sur des cultures testiculaires a un effet sur la viabilité cellulaire à forte concentration mais aucun effet n'a été mesuré à faible dose. Toutefois, *in vivo*, bien que les mycotoxines n'ont pas d'effet fort dans le testicule, il semblerait qu'une exposition avec de la FUMO conduirait à un effet positif sur la prolifération des cellules testiculaires et notamment sur les cellules germinales.

REMERCIEMENT

Nous remercions Frédéric Mercerand et toute l'équipe de l'animalerie de l'UPEAT de Nouzilly, Ce travail a été conduit dans le cadre du projet AAP CAS DAR n°1177 « MYCOVOL » et réalisé dans le cadre de l'UMT BIRD.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Broekaert N et al., J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2014 Nov 15;971:43-51)
- De Baere S et al., Anal Chim Acta. 2012 Dec 5;756:37-48
- Depoire AG. Détermination de la fumonisine B1 chez le canard après exposition à de faibles doses. Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2005, 64 p.
- Diesing AK, et al., Toxicol Lett. 2011 Jan 15;200(1-2):8-18.
- Ebrahim M et al., Arch Anim Nutr. 2014;68(5):412-22
- Foster P.M., 1984. Environ Health Perspect. (57):207-17.
- Gray T.J 1984. Food Chem Toxicol. 22(2):123-31.
- Guibert E et al., Environ Sci Pollut Res Int. 2013 May;20(5):2771-83
- Kim IH et al., Toxicol Lett. 2003 Mar 3;138(3):185-92
- Lambrot R et al., Biochimie. 2006 Nov;88(11):1831-5
- Rouiller-Fabre V et al., Ann Endocrinol (Paris). 2014 May;75(2):54-7
- Staub C. et al , 2000. Exp Cell Res. 260(1):85-95.
- Sprando RL et al., Food Chem Toxicol. 2005 Apr;43(4):623-35
- Tessari EN et al., Br Poult Sci. 2006 Jun;47(3):357-64
- Yang JY et al., Reprod Toxicol. 2007 Nov-Dec;24(3-4):381-7

Figure 1. Cellules testiculaires de poulet cultivées *in vitro* à confluence puis exposées à des concentrations croissantes de mycotoxines (Don (deoxynivalenol), Fumo (fumonisines B1), ZEA (zéaralénone)). Le cytosquelette des cellules est marqué par immunohistochimie (phalloïdine). * zone de la boîte de culture où il y a une absence de cellules dû à une mortalité cellulaire.

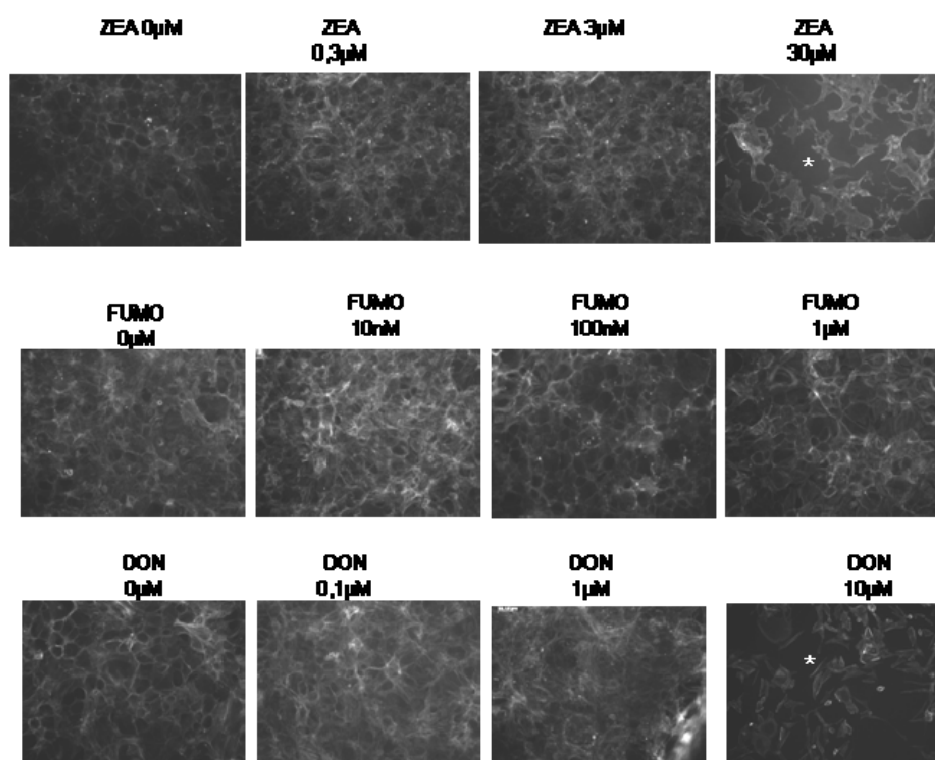


Figure 2. Mesure de la mortalité (panel Haut) et de la prolifération cellulaire (Panel Bas, pourcentage de cellules ayant incorporé de BrDU) sur une culture de cellules de Sertoli de poulet qui a été exposée avec des doses croissantes de mycotoxines (ZEA, DON, FUMO) pendant 96h. n=4. Moyenne $\pm$ SEM

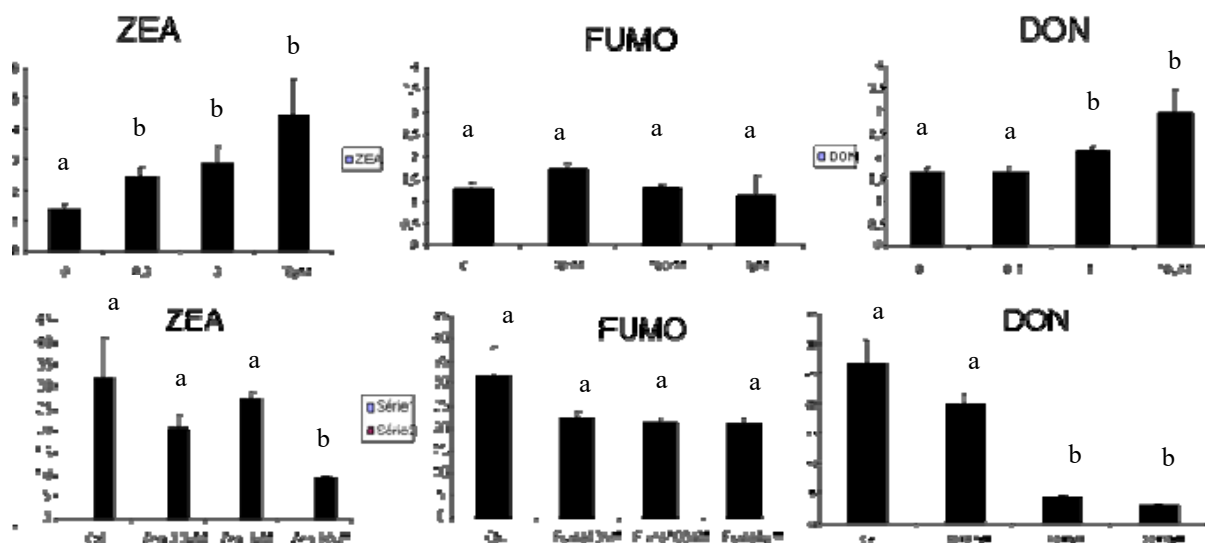


Figure 3. Diamètre des tubes séminifères chez le poulet (µm) Don (deoxynivalenol), Fumo (fumonisines), ZEA (zéaralénone), D+F+Z (deoxynivalenol, fumonisines, zéaralénone). Un minimum de 20 mesures par animal avec n=5/groupe. Moyenne $\pm$ SEM

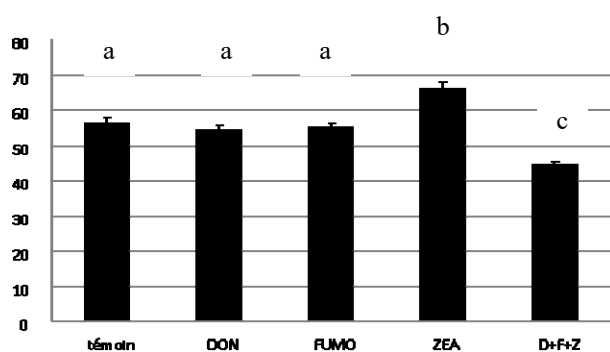


Figure 4. Concentration testiculaire du marqueur de prolifération (PCNA) dans le lysat testiculaire (ng/µg de protéines totales du lysat testiculaire). Don (deoxynivalenol), Fumo (fumonisines), ZEA (zéaralénone), D+F+Z (deoxynivalenol, fumonisines, zéaralénone). N=5/groupe. Moyenne $\pm$ SEM

