

## IMPACT DES MYCOTOXINES EN CONCENTRATION LIMITE SUR LA LIGNEE GERMINALE DU POULET

**Edith Guibert<sup>1</sup>, Sabine Alves<sup>1</sup>, Mélanie Faure<sup>1</sup>, Jean Paul Métayer<sup>2</sup>, Jean Denis Bailly<sup>3</sup>,  
Angélique Travel<sup>4</sup>, and Pascal Froment<sup>1</sup>**

*1 Equipe GCR INRA – Physiologie de la Reproduction et des Comportements - UMR INRA - CNRS (UMR 6175) - Université François Rabelais de Tours - 37380 Nouzilly (France).*

*2 ARVALIS-Institut du végétal, Station expérimentale, 91720 Boigneville*

*3 ENVT, UMR1331 Toxalim, 23 chemin des Capelles, BP 87614, 31076 Toulouse Cedex*

*4 ITAVI, Centre INRA de Tours, BP 1, 37380 Nouzilly*

*"Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'UMT BIRD"*

[pfroment@tours.inra.fr](mailto:pfroment@tours.inra.fr)

### RÉSUMÉ

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par certaines moisissures pouvant se retrouver dans l'alimentation animale et humaine. Ceci constitue un problème majeur, car ces toxines peuvent avoir des effets néfastes variés sur la santé. Actuellement, peu de travaux se sont intéressés aux conséquences d'une exposition prolongée et à faibles doses des mycotoxines sur les performances des volailles et notamment sur les performances de reproduction.

Des poulets mâles ont été nourris de 0 à 35 jours, avec soit un aliment artificiellement contaminé contenant des mycotoxines (5 mg/kg de DON, déoxynivalénol ; 20 mg/kg de FB1+FB2, fumonisine B1 et fumonisine B2 ; 0,5 mg/kg de ZEA, zéaraléone ou un mélange des trois) soit un aliment témoin exempt de mycotoxine. Nous avons analysé au niveau testiculaire des biomarqueurs de viabilité, de sécrétion et d'atteinte de cellules germinales. Une exposition à la ZEA induit une augmentation du diamètre des tubes séminifères, lieu de production des cellules germinales et . La ZEA augmente également d'un facteur 2 l'expression d'un marqueur de la prolifération et les FB1+FB2 d'un facteur 4. La production de testostérone, n'est pas modifiée dans les conditions testées. Enfin, la teneur en protéine DAZL, un marqueur des cellules germinales primordiales, est augmentée (x8) après exposition aux FB1+FB2.

En conclusion, l'aliment multicontaminé testé distribué à des poulets avant l'âge de 35 jours, n'induirait pas d'effet délétère sur la formation du testicule, ni sur la quantité des cellules germinales immatures. Toutefois nous ne pouvons exclure des répercussions à la vie reproductive adulte.

### ABSTRACT

#### Consequences of mycotoxins exposure at the testicular levels

Mycotoxins are secondary metabolites produced by microfungi. Animal or human feed contamination by these toxins is a major problem, because mycotoxins can be harmful on health. These effects are well documented for acute exposure (short exposure to high doses). However, few studies have examined the effects of chronic exposure with low doses of mycotoxins on poultry performance and particularly on reproductive performance.

Male chickens were fed from hatch to 35-day-old with contaminated food (5 mg / kg DON, deoxynivalenol ; or 20 mg/kg FB1+FB2, fumonisin B1 & B2 or 0.5 mg / kg ZEA, zearaleone), or a control diet. We have analyzed in the testis, some biomarkers dedicated to viability, secretion and quantity of germ cells. Following a ZEA exposure, a mycotoxin with estrogenic activity, the diameter of the seminiferous tubule was increased and was associated to an increase in a proliferation marker in testicular lysates by 2 fold. The production of testosterone was not altered whatever mycotoxins exposure. Finally, the content in Dazl protein, a marker of primordial germ cells, was increased (x8) after exposure to FB1+FB2.

In conclusion, the presence of mycotoxins in chicken feed, before 35 day-old did not induce a deleterious effect on the testis maturation, and did not affect the quantity of immature germ cells. However we can not exclude consequences in adult.

## INTRODUCTION

La sensibilité testiculaire aux molécules toxiques (Rouiller-Fabre et al., 2014) est due aux nombreuses fonctions de l'organe, c'est le lieu d'une prolifération et d'une différenciation cellulaire active. Ces fonctions sont liées à la production des gamètes. Des études de toxicité aiguë à des mycotoxines ont déjà été réalisées chez le rat et chez le poulet et ont 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 zéaraléone, comme le DON conduit à une réduction du nombre de spermatozoïdes vivants (Yang et al., 2007 ; Kim et al., 2003).

Au cours de notre étude, nous avons mesuré plusieurs biomarqueurs de l'atteinte des fonctions testiculaires en croissance en lien avec l'exposition des volailles aux mycotoxines: mort cellulaire, prolifération, maturation, stress oxydatif, production de testostérone et atteinte au niveau des cellules germinales (Lambrot et al., 2006 ; Guibert et al., 2013).

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. 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 (FB1+FB2), 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'ENVT (Jean Denis Bailly), et incorporées sous forme de poudre à l'aliment afin d'obtenir les concentrations choisies.

### 1.2. Prélèvements des échantillons

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 sera broyé et permettra d'effectuer des dosages biochimiques sur le lysat testiculaire.

### 1.3. Préparation du lysat testiculaire

Les testicules prélevées ont été broyées dans 500µl de tampon phosphate (PBS, Phosphate buffered saline, pH 7.4), 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.

### 1.4. 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. Nous avons également mesuré l'activité catalase (Cayman Chemicals) et la capacité antioxydante (Cayman Chemicals) comme mesure du stress oxydatif. Ces dosages ont été réalisés à l'aide de kits commerciaux selon les renseignements des fournisseurs.

### 1.5. Dosage de la testostérone

Les concentrations intratesticulaires de testostérone ont été mesurées par le laboratoire de dosages hormonaux de l'unité PRC du Centre INRA Val de Loire à l'aide d'un dosage radio-immunologique. Les échantillons ont été dosés en duplicate. Le test de sensibilité est de 15 pg / tube et le coefficient de variation intra-assay est de 5,3% (Hochereau-De Reviers et al., 1990).

### 1.6. Analyses statistiques

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

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1- Poids testiculaire et analyse histologique

Le poids moyen des testicules n'est pas affecté par les 4 aliments expérimentaux. 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+FB1+FB2 :  $44,82 \pm 0,73\mu\text{m}$  ;  $p \leq 0.001$ ). L'analyse histologique n'a pas montré d'autre différence entre les 5 groupes de traitement.

### 2.2- Prolifération

Le dosage du marqueur de la prolifération (PCNA) est augmenté d'environ 4 fois en présence de FB1+FB2 ( $p \leq 0.001$ ) et le marqueur de cellules germinales (DAZL) est augmenté de 30 fois ( $p \leq 0.01$ ). Il est intéressant de préciser que les fumonisines FB1+FB2 présentent, selon la concentration d'exposition, des propriétés prolifératives décrites lors d'expériences in vitro et in vivo comme sur les cellules de rein de singe

(Huang et al., 1995), les cellules hépatiques de rat, les cellules du canal biliaires de poulet (après 41 jours d'exposition FB1 à 50 mg/kg soit 2,5X la dose utilisée dans notre étude) (Tessari et al., 2006). Il est à noter qu'une action anti-prolifération de FB1 a été décrite sur des lymphocytes de poulet en culture *in vitro* après 40h d'exposition (2,5µg/ml) (Li et al., 1999).

### 2.3- Mortalité cellulaire

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. Des résultats similaires ont été observés à l'aide d'une autre technique qui localise les cellules mortes sur des coupes histologiques du testicule (marquage TUNEL, Figure 1).

### 2.4- Production de testostérone

Nous avons mesuré les concentrations intra testiculaire de testostérone. Aucune différence n'a été observée entre les différents lots.

### 2.5- Evaluation du stress oxydatif intratesticulaire.

Aucune différence de capacité antioxydante n'a été mesurée entre les différents lots. Par contre l'activité catalase (enzyme qui permet d'éliminer le peroxyde d'hydrogène) est diminuée ( $p \leq 0,05$ ) en présence des 3 mycotoxines (Figure 2). Bien que des études effectuées chez le rat et le poulet suggèrent que la consommation de mycotoxines, dont le DON, entraîne un important stress oxydatif (Surai et Dvorska, 2005 ;

Andretta et al., 2011), les concentrations faibles sur une cinétique longue, ne semblent pas induire d'élévation du stress oxydatif dans le testicule de poulet. Une hypothèse envisageable serait le choix de la dose ainsi que l'absorption au niveau du tissu qui est différente.

### CONCLUSION

Les résultats décrits ci-dessus suggèrent que les mycotoxines n'ont pas d'effet fort dans le testicule. Les fumonisines auraient un effet positif sur la prolifération des cellules testiculaires et notamment sur les cellules germinales. De plus un des marqueurs du stress oxydatif a montré une baisse de l'activité antioxydante en présence des 3 mycotoxines, ce qui peut suggérer une atteinte de la qualité des cellules germinales. Toutefois d'autres marqueurs n'ont pas montré être affectés par les mycotoxines. Ainsi le poids testiculaire, la mesure de la mortalité cellulaire et la production de testostérone, d'interleukine 1β, interleukine 6, et d'interféron γ ne sont pas affectés.

Au cours de l'année 2013, des prélèvements ont été réalisés sur une autre espèce d'intérêt le dindon. L'analyse des biomarqueurs est en cours d'études et devrait permettre de faire une comparaison par espèces des effets sur la sensibilité testiculaire après des traitements avec des mycotoxines.

### REMERCIEMENTS

Nous remercions Frédéric Mercierand 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.

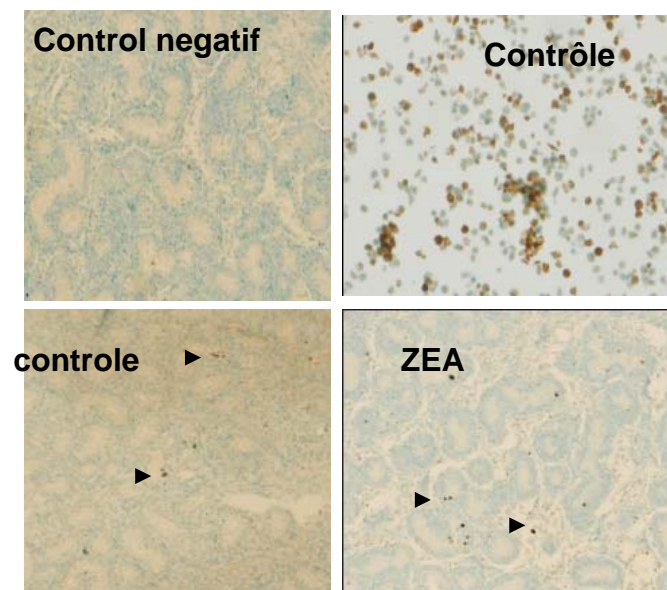
### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Andretta I, Kipper M, Lehnen CR, Hauschild L, Vale MM, Lovatto PA. Meta-analytical study of productive and nutritional interactions of mycotoxins in broilers. *Poult Sci.* 2011 Sep;90(9):1934-40.
2. Diesing AK, Nossol C, Panther P, Walk N, Post A, Klues J, Kreutzmann P, Dänicke S, Rothkötter HJ, Kahlert S. Mycotoxin deoxynivalenol (DON) mediates biphasic cellular response in intestinal porcine epithelial cell lines IPEC-1 and IPEC-J2. *Toxicol Lett.* 2011 Jan 15;200(1-2):8-18.
3. Guibert E, Prieur B, Cariou R, Courant F, Antignac JP, Pain B, Brillard JP, Froment P. Effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on chicken germ cells cultured in vitro. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2013 May;20(5):2771-83.
4. Hochereau-de Reviers MT, Perreau C. Comparisons of endocrinological and testis parameters in 18-month-old Ile de France and Romanov rams. *Domest Anim Endocrinol.* 1990 Jan;7(1):63-73.
5. Huang C, Dickman M, Henderson G, Jones C. Repression of protein kinase C and stimulation of cyclic AMP response elements by fumonisin, a fungal encoded toxin which is a carcinogen. *Cancer Res.* 1995 Apr 15;55(8):1655-9.
6. Kim IH, Son HY, Cho SW, Ha CS, Kang BH. Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats. *Toxicol Lett.* 2003 Mar 3;138(3):185-92.
7. Lambrot R, Livera G, Coffigny H, Pairault C, Frydman R, Habert R, Rouiller-Fabre V. A new method for toxicity assays on human and mouse fetal testis. *Biochimie.* 2006 Nov;88(11):1831-5.
8. Li YC, Ledoux DR, Bermudez AJ, Fritsche KL, Rottinghaus GE. Effects of fumonisin B1 on selected immune responses in broiler chicks. *Poult Sci.* 1999 Sep;78(9):1275-82.
9. Rouiller-Fabre V, Habert R, Livera G. Effects of endocrine disruptors on the human fetal testis. *Ann Endocrinol (Paris).* 2014 May;75(2):54-7.

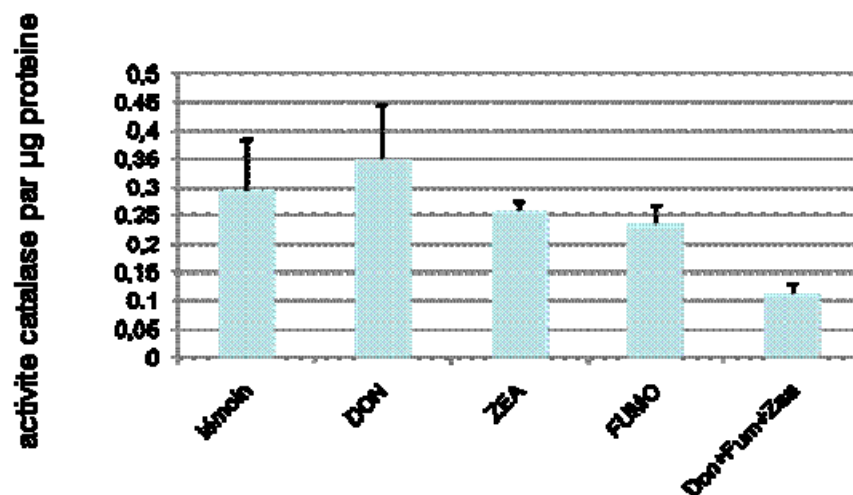
10. Sprando RL, Collins TF, Black TN, Olejnik N, Rorie JJ, Eppley RM, Ruggles DI. Characterization of the effect of deoxynivalenol on selected male reproductive endpoints. *Food Chem Toxicol.* 2005 Apr;43(4):623-35
11. Surai, PF, Dvorska, JE, 2005. Effects of mycotoxins on antioxidant status and immunity. In: Diaz, D. (Ed.), *Mycotoxin Blue Book*. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 93–137
12. Tessari EN, Oliveira CA, Cardoso AL, Ledoux DR, Rottinghaus GE. Effects of aflatoxin B1 and fumonisin B1 on body weight, antibody titres and histology of broiler chicks. *Br Poult Sci.* 2006 Jun;47(3):357-64
13. Yang JY, Wang GX, Liu JL, Fan JJ, Cui S. Toxic effects of zearalenone and its derivatives alpha-zearalenol on male reproductive system in mice. *Reprod Toxicol.* 2007 Nov-Dec;24(3-4):381-7

**Figure 1.** Analyse de la mort cellulaire des cellules testiculaires par marquage immunologique sur une coupe de testicule (marquage TUNEL)

Nous pouvons noter qu'il n'y a pas de différence entre le groupe contrôle et le groupe exposé à la zéaraléone (ZEA). Fleche : cellule marquée



**Figure 2** Dosage de l'activité catalase testiculaire après exposition par les mycotoxines (DON : déoxynivalenol ; ZEA : Zéaraléone ; FUMO : fumonisine-B1+fumonisine B2)







Edith Guibert<sup>1</sup>, Sabine Alves<sup>1</sup>, Mélanie Faure<sup>1</sup>, Jean Paul Métayer<sup>2</sup>,  
Jean Denis Bailly<sup>3</sup>, Angélique Travel<sup>4</sup>, Pascal Froment<sup>1</sup>

Partenariat

INRA PRC<sup>1</sup>, Arvalis<sup>2</sup>,  
ENV<sup>3</sup>, ITAVI<sup>4</sup>



pfroment@tours.inra.fr

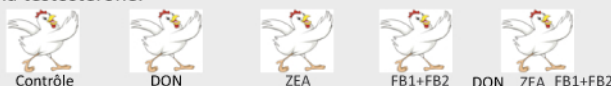
## IMPACT DES MYCOTOXINES EN CONCENTRATION LIMITE SUR LA LIGNEE GERMINALE DU POULET

Des études de toxicité aiguë à des mycotoxines réalisées chez le rat et le poulet ont montré que le déoxynivalénol (DON) ou la zéaralénone (ZEA) conduisaient à des lésions testiculaires pouvant aller jusqu'à une diminution de la qualité et de la production de sperme (Yang et al., 2007 ; Kim et al., 2003). Toutefois, rares sont les études permettant d'évaluer les effets d'expositions chroniques, aux seuils limites réglementaires. L'objectif de cette étude est d'évaluer les conséquences au niveau du testicule d'une exposition chronique aux mycotoxines. Nous avons également rechercher des marqueurs sensibles et spécifiques de l'exposition dans la gonade.

### MATERIELS ET METHODES

#### ➤ Animaux et aliments

Au cours de notre étude, nous avons exposé des poulets de souche chair pendant les 35 jours post-éclosion à des aliments contaminés par des mycotoxines à la concentration maximale tolérée. Nous avons analysé plusieurs fonctions testiculaires en lien avec son activité : croissance testiculaire, contenu en cellules germinales, stress oxydatif, et production de la testostérone.



Cinq groupes de 14 poulets de souche Ross PM3 ont reçu 4 aliments expérimentaux (contenant soit 5 mg/kg de déoxynivalénol (DON), soit 20 mg/kg de fumonisines FB1+FB2 (FUMO), soit 0,5 mg/kg de zéaralénone (ZEA), ou un aliment contenant simultanément les 3 mycotoxines) ; le 5e aliment est exempt de mycotoxines.

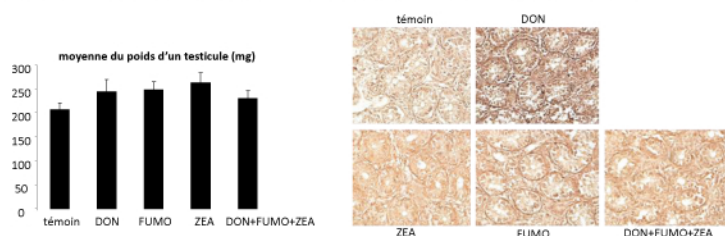
Les poulets ont eu accès à volonté à cette alimentation de 0 à 35 jours d'âge. L'aliment a été contaminé à l'aide de mycotoxines produites sur maïs à l'ENV<sup>3</sup> (Jean Denis Bailly), et incorporées sous forme de poudre à l'aliment afin d'obtenir les concentrations choisies.

#### ➤ Prélèvements des échantillons

A J35, les testicules ont été prélevés, pesés, fixés pour des analyses histologiques ou congelés immédiatement à -80°C pour des dosages biochimiques sur le lysat testiculaire.

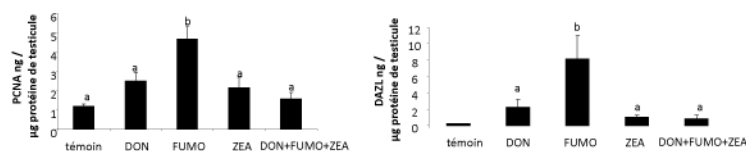
#### Poids testiculaire et analyse histologique

Le poids moyen des testicules n'est pas affecté par la présence de mycotoxines. L'analyse histologique n'a pas montré de différence entre les 5 groupes.



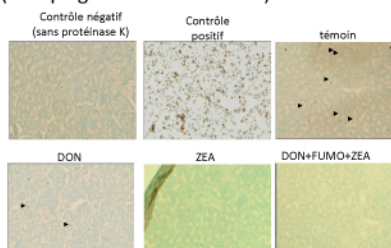
#### Prolifération

L'exposition à 20 mg/kg de FUMO augmente la quantité testiculaire du marqueur de la prolifération cellulaire (PCNA) ( $p < 0.001$ ) et du marqueur de cellules germinales (DAZI) ( $p < 0.01$ ).



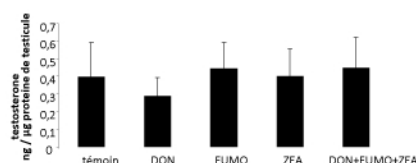
#### Mortalité cellulaire

Aucune différence de mortalité cellulaire n'a été observée. (marquage TUNEL ci-dessous)



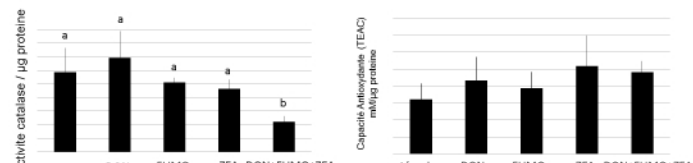
#### Production de testostérone

La concentration intra testiculaire de testostérone est similaire entre les différents lots.



#### Evaluation du stress oxydatif intra-testiculaire.

L'activité catalase (enzyme qui permet d'éliminer le peroxyde d'hydrogène), est diminuée ( $p < 0.05$ ) en présence des 3 mycotoxines. Mais aucune différence de capacité anti-oxydante (TEAC) dans le testicule n'a été mesurée entre les différents lots.



### Conclusion

Les résultats suggèrent que les mycotoxines n'ont pas d'effet fort dans les testicules et leur activité. L'exposition aux FUMO augmente la prolifération des cellules testiculaires et notamment les cellules germinales. De plus, un des marqueurs du stress oxydatif a montré une baisse de l'activité anti-oxydante en présence DON+FUMO+ZEA, ce qui peut suggérer une atteinte de la qualité des cellules germinales. Toutefois, les autres marqueurs n'ont pas été régulés par l'exposition aux mycotoxines. Ainsi le poids testiculaire, la mesure de la mortalité cellulaire et la production de testostérone, d'interleukine 1 $\beta$ , interleukine 6, et d'interféron  $\gamma$  n'ont pas été modifiés.

### Références

Kim IH et al., Toxicol Lett. 2003 Mar 3;138(3):185-92  
Yang JY et al., Reprod Toxicol. 2007 Nov-Dec;24(3-4):381-7

### Remerciements

Nous remercions Frédéric Mercierand 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.