

# Le stress oxydatif est-il responsable de la toxicité des mycotoxines sur le système reproducteur mâle ?

Myriam BOUSLAMA | myriam.bousslama@gmail.com

INRS - EVAD - Paris

Mots clés : Cellules de Leydig, cytotoxicité, mycotoxine, stéroïdogénèse, stress oxydatif, testicule

Les mycotoxines sont des substances toxiques sécrétées par des champignons microscopiques ou moisissures, qui peuvent contaminer de nombreux aliments. Certaines moisissures du genre *Fusarium*, qui contaminent fréquemment les céréales en Europe, sécrètent des mycotoxines ou trichothécènes, tels le déoxynivalénol (DON), la toxine T2, et la zéaralénone (ZEA). Elles sont responsables de nombreux effets sur la santé chez l'animal, notamment des effets toxiques pour la reproduction. La ZEA est un perturbateur endocrinien dont les effets sont principalement liés à ses propriétés œstrogéniques. *In vivo*, ses effets sur la reproduction sont bien documentés chez la femelle mais les études sur la reproduction mâle sont plus rares. Chez la souris, elle perturbe le système reproducteur mâle en diminuant le niveau de testostérone, la qualité du sperme et la fertilité(1). Des effets sur la reproduction mâle ont également été observés pour DON (2) et la toxine T2 (3) chez le rongeur mais les mécanismes impliqués restent inconnus.

Cette note analyse deux études évaluant les effets cytotoxiques de ces trois mycotoxines sur des lignées murines de cellules de Leydig\*. L'utilisation de différentes molécules antioxydantes pour prévenir les effets cytotoxiques de ces mycotoxines est testée et permet d'indiquer si les mécanismes impliqués dans les troubles de reproduction mâle sont liés au stress oxydatif\*.

## La prévention du stress oxydatif lié au deoxynivalenol et à la zéaralénone ne restaure pas les fonctions des cellules de Leydig MA-10.

Savard C. et al. (2016). Prevention of deoxynivalenol- and zearalenone-associated oxidative stress does not restore MA-10 Leydig cell functions. *Toxicology*, vol. 341–343: p.17-27.

### Résumé

Cette étude évalue l'effet des mycotoxines DON et ZEA, seules ou en combinaison, sur la viabilité des cellules de Leydig, la stéroïdogénèse\* et le stress oxydatif. L'efficacité de deux antioxydants, vitamine E et sésamine, pour prévenir les effets délétères des mycotoxines a également été testée. Des cellules de Leydig murines MA-10 ont été exposées pendant 24 heures à des concentrations croissantes de DON (0,1 à 2 µM), ZEA (5 à 100 µM) ou à un mélange de DON (0,05, 0,1 et 0,25 µM) et de ZEA (10, 20 et 30 µM). Les résultats montrent que la viabilité cellulaire diminue à partir de 0,25 µM de DON (IC<sub>50</sub>\* = 0,26 µM) et à partir de 25 µM de ZEA (IC<sub>50</sub>=34 µM). Aux concentrations de DON n'affectant pas la viabilité cellulaire, l'expression basale des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse (*Cyp11a*, *Hsd3b*, *Lhr*, *Nr4a1*, *Star*) n'est pas modifiée. Cependant, en réponse à la forskoline\*, l'expression des gènes *Lhr*, *Nr4a1* et *Star* est modifiée. Pour la ZEA, l'expression des gènes est altérée avec ou sans forskoline\*. En outre, à la fois pour DON et ZEA, l'inhibition de l'expression du gène *Star* en réponse à la forskoline est plus nette que pour les autres gènes testés, DON ou ZEA seules n'ont pas d'effet sur la sécrétion basale de progestérone mais entraînent une diminution de sa sécrétion en réponse à la forskoline. L'exposition au mélange des deux mycotoxines DON et ZEA n'a pas d'effets additifs ou synergiques sur la viabilité cellulaire, l'expression

du gène *Star* et la sécrétion de progestérone avec ou sans forskoline. Les cellules de Leydig exposées à DON (0,25 µM) ou ZEA (30 µM) augmentent la production de ROS\* mais le prétraitement par la sésamine et la vitamine E, seules ou en combinaison, permet de réduire le stress oxydatif généré par ces mycotoxines et d'augmenter la viabilité cellulaire. En revanche, ce traitement ne permet pas de restaurer une production normale de progestérone.

### Commentaire

Les cellules utilisées sont des cellules de Leydig murines tumorales et fonctionnelles du point de vue de la stéroïdogénèse. Ces cellules ne produisent pas de testostérone car l'enzyme responsable de l'hydroxylation de la progestérone est faiblement exprimé. Par conséquent le produit synthétisé au cours de la stéroïdogénèse dans les cellules MA-10 est principalement la progestérone.

Il s'agit de la première étude à décrire un effet cytotoxique de DON sur les cellules de Leydig (IC<sub>50</sub> 130 fois supérieure à celle de ZEA). L'utilisation des antioxydants confirme que le stress oxydatif induit par DON et ZEA est responsable de cette cytotoxicité.

Aux concentrations n'affectant pas la viabilité cellulaire, DON et ZEA diminuent la sécrétion de progestérone en réponse à la forskoline. Ces résultats sont en accord avec ceux observés sur des cellules de la granulosa\* de bovins (4) et sur la lignée cellulaire H295R\* issue d'un carcinome surrénalien humain (5,6) pour les deux mycotoxines ou sur des cultures primaires de cellules de Leydig murines pour ZEA (7). L'inhibition du gène *Star*, initiateur du transport de cholestérol vers la mitochondrie, montre que la stéroïdogénèse est altérée dès les premiers stades de biosynthèse. En revanche, les antioxydants ne permettent pas d'améliorer la stéroïdogénèse. D'autres mécanismes pourraient expliquer

l'altération de la stéroïdogenèse, tels que l'inhibition de la synthèse protéique pour DON, des actions directs sur les récepteurs hormonaux, des modifications épigénétiques<sup>(8)</sup> ou une perturbation métabolique par activation des récepteurs PPAR<sup>(9)</sup>.

### Cytotoxicité et dommages de la toxine T2 sur les cellules de Leydig TM3

Yuan Z. et al. (2016). T-2 toxin-induced cytotoxicity and damage on TM3 Leydig cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 181–182: p.47-54.

#### Résumé

Cette étude évalue les effets cytotoxiques de la toxine T2 sur une lignée de cellules de Leydig murines (TM3), aux concentrations de 0, 1, 10 et 100 nM pendant 24 heures. La viabilité cellulaire, évaluée par le test au MTT\*, diminue de manière dose-dépendante (82,9 - 63,5 et 32,8 % de viabilité cellulaire pour les trois concentrations testées respectivement). De même, la sécrétion de l'enzyme LDH\* est augmentée de 100 et 200 % aux concentrations de 10 et 100 nM. Un stress oxydatif, observé aux trois concentrations testées, est caractérisé par une diminution dose-dépendante de l'activité des enzymes anti-oxydantes (SOD\*, CAT\*, GPX\*), une augmentation de la MDA\* et une augmentation de la production de ROS mesuré par le test fluorimétrique avec la DCFH-DA\*. Aux trois concentrations (1, 10 et 100 nM) les résultats indiquent une toxicité caractérisée par l'entrée en apoptose des cellules de Leydig (12,8 ; 16,7 et 23,13 % des cellules respectivement) et des lésions de l'ADN (pourcentage d'ADN de queue\* : 7,1 ; 17,1 et 29,6% respectivement). Enfin, le traitement avec l'antioxydant Trolox protège les cellules TM3 contre la cytotoxicité induite par la toxine T2.

#### Commentaire

Des études précédentes ont montré que la toxine T2 altère la stéroïdogenèse des cellules de Leydig murines (10). Aux mêmes concentrations, la toxine T2 est toxique pour les cellules de Leydig, avec une inhibition de la prolifération cellulaire, une augmentation de la peroxydation lipidique, une altération de la membrane cellulaire, des lésions de l'ADN et une entrée en apoptose. Le stress oxydatif, caractérisé par un déséquilibre entre une production accrue de ROS et une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes, est responsable de cette cytotoxicité. En revanche, et contrairement à l'étude précédente, la stéroïdogenèse n'est pas analysée et il aurait été intéressant de connaître l'effet de la toxine T2 sur la stéroïdogenèse à des doses non toxiques et le pouvoir antioxydant du Trolox sur l'altération de la stéroïdogenèse observée dans les études précédentes.

#### CONCLUSION GÉNÉRALE

La ZEA, DON, et la toxine T2 induisent un stress oxydatif qui joue un rôle majeur dans les effets cytotoxiques sur les cellules de Leydig, conforté par la réduction du stress en présence d'antioxydants. En revanche, à des concentrations n'affectant pas la viabilité cellulaire, ces mycotoxines peuvent altérer la stéroïdogenèse par des mécanismes indépendants du stress oxydatif. Les différences interspèces dans les fonctions des cellules de Leydig et dans les effets des mycotoxines sur la stéroïdogenèse soulignent l'intérêt de développer un modèle cellulaire de cellules de Leydig humaines pour évaluer les risques pour la santé humaine. Néanmoins, les mécanismes de cytotoxicité des mycotoxines via le stress oxydatif et l'altération de la stéroïdogenèse ont été observés dans différents modèles cellulaires, in vivo et dans plusieurs espèces. Même si les mécanismes ne sont pas clairement identifiés, l'ensemble de ces résultats souligne l'importance de prendre en compte les effets perturbateurs endocriniens dans l'évaluation des risques liés à la présence de ces mycotoxines dans l'alimentation. Il convient de s'assurer à l'avenir que les études pivots utilisées pour la définition des valeurs toxicologiques de référence de ces mycotoxines prennent en compte les niveaux d'exposition susceptibles de montrer des effets sur la reproduction.

#### GENERAL CONCLUSION

*ZEA, DON and T2 toxin induce oxidative stress that plays a major role in their cytotoxic effects on Leydig cells. This toxicity is reduced by antioxidants. However, at non-toxic concentrations, these mycotoxins may affect steroidogenesis through an oxidative stress-independent mechanism. Interspecies differences in the functions of Leydig cells and in the effects of mycotoxins on steroidogenesis emphasize the need to develop a human Leydig cell model to assess human health risk. Nevertheless, oxidative stress-dependent cytotoxicity of mycotoxins and steroidogenesis disruption have been observed in different cell models, in vivo and in several species. Although the mechanisms were not clearly identified, all results underline the importance of taking into account endocrine disruption effects in risk assessment of mycotoxins in food. It should be ensured in future that the pivotal studies used to define the toxicological reference values of these mycotoxins take into account the levels of exposure likely to show effects on reproduction.*

## Lexique

**Apoptose** : mort cellulaire programmée.

**Catalase (CAT)** : enzyme qui réduit le stress oxydatif en catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et oxygène.

**Cellules de Leydig** : cellules situées dans l'espace interstitiel testiculaire, entre les tubules séminifères, assurant la biosynthèse des stéroïdes dont le plus important est la testostérone.

**Cellules de Sertoli** : cellules de soutien aux cellules germinales, situées au sein des tubes séminifères, et contrôlant la spermatogenèse.

**27-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)** : sonde fluorescente communément utilisée pour évaluer le stress oxydatif.

**Glutathion peroxydase (GPX)** : enzyme qui réduit le stress oxydatif en transformant les hydroperoxydes organiques.

**Forskoline** : activateur de la voie AMPc qui stimule la stéroïdogénèse

**Granulosa** : cellules folliculaires granuleuses entourant l'ovocyte et la cavité liquidienne du follicule ovarien et responsable de la sécrétion de la progestérone.

**H295R** : lignée cellulaire de carcinome surrénalien humain, utilisée dans l'essai *in vitro* de stéroïdogénèse décrit dans la ligne directrice de l'OCDE n°456.

**IC<sub>50</sub>** : concentration inhibitrice médiane. Il s'agit ici de la concentration nécessaire pour inhiber la viabilité cellulaire de la moitié de la population cellulaire.

**LDH** : lactate déshydrogénase, enzyme relargué lors de la mort cellulaire, à cause de la perte de l'intégrité plasmatique. L'augmentation de l'activité de cette enzyme cytoplasmique dans le surnageant de culture cellulaire peut être mesurée par un test colorimétrique ce qui reflète l'altération de la perméabilité membranaire des cellules.

**Malondialdéhyde (MDA)** : marqueur de la peroxydation lipidique (stress oxydatif).

**Modifications épigénétiques** : modifications qui ne sont pas codées par l'ADN (méthylation de l'ADN, modifications d'histones et remodelage des nucléosomes).

**Perturbateur endocrinien** : substance exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, l'action ou l'élimination d'hormones naturelles

**Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR)** : récepteurs activés par les inducteurs de la prolifération des péroxysomes. Famille des récepteurs du noyau cellulaire impliqués dans le métabolisme des lipides.

**Pourcentage d'ADN de queue** : critère mesuré lors du test des comètes et qui reflète l'ampleur des cassures de l'ADN, exprimé sous forme de pourcentage.

**Reactive Oxygen Species (ROS)** ou espèces réactives de l'oxygène : Il s'agit d'espèces chimiques oxygénées telles que des radicaux libres, des ions oxygénés et des peroxydes, rendus chimiquement très réactifs par la présence d'électrons de valence non appariés. Elles sont produites de façon accrue lors d'un stress oxydant.

**Superoxyde dismutase (SOD)** : enzyme réduisant le stress oxydatif.

**Stress oxydatif** : type d'agression des constituants de la cellule dû aux espèces réactives oxygénées et azotées oxydantes.

**Stéroïdogénèse** : synthèse des hormones stéroïdiennes, c'est-à-dire ayant pour origine le cholestérol.

**Test MTT** : test colorimétrique pour évaluer la viabilité cellulaire. Dans les cellules vivantes, un sel de tétrazolium jaune (le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT)) est réduit par une enzyme mitochondriale en formazan de couleur bleue. L'intensité de la coloration bleue est proportionnelle au nombre de cellules vivantes

## Publications de référence

**1 Yang JY, Wang GX, Liu JL, et al.** Toxic effects of zearalenone and its derivatives  $\alpha$ -zearalenol on male reproductive system in mice. *Reproductive Toxicology* 2007, 24(3-4):381-387.

**2 Sprando RL, Collins TF, Black TN, et al.** Characterization of the effect of deoxynivalenol on selected male reproductive endpoints. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 2005, 43(4):623-635.

**3 Yang JY, Zhang YF, Liang AM, et al.** Toxic effects of T-2 toxin on reproductive system in male mice. *Toxicology and industrial health* 2010, 26(1):25-31.

**4 Pizzo F, Caloni F, Schreiber NB, et al.** In vitro effects of deoxynivalenol and zearalenone major metabolites alone and combined, on cell proliferation, steroid production and gene expression in bovine small-follicle granulosa cells. *Toxicology : official journal of the International Society on Toxicology* 2016, 109:70-83.

**5 Frizzell C, Ndossi D, Verhaegen S, et al.** Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha-and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. *Toxicology Letters* 2011, 206(2):210-217.

**6 Ndossi DG, Frizzell C, Tremoen NH, et al.** An in vitro investigation of endocrine disrupting effects of trichothecenes deoxynivalenol (DON), T-2 and HT-2 toxins. *Toxicology Letters* 2012, 214(3):268-278.

**7 Liu Q, Wang Y, Gu J, et al.** Zearalenone inhibits testosterone biosynthesis in mouse Leydig cells via the crosstalk of estrogen receptor signaling and orphan nuclear receptor Nur77 expression. *Toxicology in Vitro* 2014, 28(4):647-656.

**8 Han J, Wang Q-C, Zhu C-C, et al.** Deoxynivalenol exposure induces autophagy/apoptosis and epigenetic modification changes during porcine oocyte maturation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2016, in press.

**9 Li Y, Zhang B, Huang K, et al.** Mitochondrial proteomic analysis reveals the molecular mechanisms underlying reproductive toxicity of zearalenone in MLTC-1 cells. *Toxicology* 2014, 324:55-67.

**10 Yang JY, Zhang YF, Meng XP, et al.** T-2 toxin inhibits gene expression and activity of key steroidogenesis enzymes in mouse Leydig cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2015, 29(5):1166-1171.

## Revues de la littérature

**Tavares RS, Escada-Rebello S, Correia M, et al.** The non-genomic effects of endocrine-disrupting chemicals on mammalian sperm. *Reproduction* 2016, 151(1):R1-R13.

**Odermatt A, Strajhar P, Engeli RT.** Disruption of steroidogenesis: Cell models for mechanistic investigations and as screening tools. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2016, 158:9-21.

**Escrivá L, Font G, Manyes L.** In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. *Food and Chemical Toxicology* 2015, 78:185-206.

**Wang X, Wu Q, Wan D et al.** Fumonisin : oxidative stress-mediated toxicity and metabolism in vivo and in vitro. *Archives of Toxicology* 2016, 90(1):81-101.

## Autres publications identifiées

**Deng C, Ji C, Qin W, Cao X, et al.** Deoxynivalenol inhibits proliferation and induces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2016, 43:232-241.

*Cette étude évalue les effets toxiques de DON sur les cellules endothéliales humaines isolées à partir de la veine ombilicale (concentrations de 100 à 1000 ng/L). DON inhibe la viabilité et la prolifération cellulaires, et provoque un stress oxydatif et une apoptose des cellules endothéliales.*

**Zheng W, Pan S, Wang G, et al.** Zearalenone impairs the male reproductive system functions via inducing structural and functional alterations of sertoli cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2016, 42:146-155.

*Cette étude évalue les effets toxiques de la ZEA sur les cellules de Sertoli de rat (concentrations de 5 à 20 µg/mL pendant 24 heures). La ZEA perturbe les fonctions sécrétoires des cellules de Sertoli, la structure du cytosquelette et l'ultrastructure des cellules, ce qui contribuerait à la toxicité reproductive mâle de cette mycotoxine.*

**Patrick SM, Bornman MS, Joubert AM, et al.** Effects of environmental endocrine disruptors, including insecticides used for malaria vector control on reproductive parameters of male rats. *Reproductive Toxicology* 2016, 61:19-27.

*Dans cette étude chez le rat, l'exposition in utero et pendant la lactation à un mélange de perturbateurs endocriniens dont la ZEA (2,5µg/kg) provoque une augmentation du poids des testicules, une altération histologique des tubes séminifères et une augmentation de la concentration de testostérone sérique.*

## Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt