



Stratégies d'atténuations des effets combinés du déoxynivalénol et de la zéaralénone sur des cellules intestinales porcines

Asmita THAPA (1), Blanaid WHITE (1), Dermot WALLS (1), Karina HORGAN (2)

(1) School of Chemical Sciences, Dublin City University, Dublin, Ireland

(2) Alltech Bioscience Centre, Dunboyne, Co. Meath, Ireland

khorgan@alltech.com

Mitigation strategies to combat the damaging combinatorial effects of Deoxynivalenol and Zearalenone in porcine intestinal cells

Deoxynivalenol (DON) and Zearalenone (ZEN) are common mycotoxins that frequently co-occur, and there is an urgent need to develop mycotoxin management strategies for combined mycotoxin exposures. The effects of combined mycotoxins have been shown to vary depending on the cell/animal used, the concentration of mycotoxins, the exposure time and type of damage analysed. The aim of this study was to investigate the combinatorial effects of DON and ZEN on IPEC-J2 cells and to examine the protective effects of selenium enriched yeast and combination of yeast cell wall and algae Sel-Plex and Mycosorb A+ on DON + ZEN induced toxicity. Protective effects of the feed supplements were observed when cells were exposed to 0.9 ppm DON + 0.25 ppm ZEN and 0.9 ppm DON + 25 ppm DON induced cytotoxicity. A significant reduction in cell toxicity was observed when cells were supplemented with both products, alone and in combination ($P < 0.01$). The comet and TUNEL assays measuring DNA damage and apoptosis, also demonstrated the mitigation capabilities of both products against 0.9 ppm DON + 25 ppm ZEN induced DNA damage and apoptosis, respectively. A significant reduction in DNA damage was noted when both products were supplemented to cells ($P < 0.001$). Mycotoxin induced apoptosis was also reduced in treated cells ($P < 0.001$) for selenium enriched yeast and for yeast algae product ($P < 0.01$) respectively when used on their own. Under the conditions of this study a mixture of the mycotoxins caused more cytotoxicity than the mycotoxins did individually. Treating the cells with both products reduced cellular toxicity, DNA damage and apoptosis in the cells, indicating the potential role for these products in a mitigation strategy against mycotoxin damage.

INTRODUCTION

L'épithélium intestinal peut être exposé aux mycotoxines après la consommation d'aliments contaminés car il constitue la première barrière contre les toxines présentes dans l'alimentation. L'épithélium est également important pour l'absorption des nutriments. L'ingestion de mycotoxines peut avoir de nombreux effets nocifs, dont l'altération des fonctions de barrière intestinale ainsi que de l'absorption des nutriments (Liew *et al.*, 2018).

Le déoxynivalénol (DON) et la zéaralénone (ZEN) sont des mycotoxines qui coexistent fréquemment (Streit *et al.* 2012), ce qui nécessite de développer des stratégies de gestion des expositions combinées aux mycotoxines. Il a été démontré que les effets synergiques des mycotoxines varient en fonction de la cellule ou de l'animal, de la concentration de mycotoxines, du temps d'exposition et du type de dommage analysé (Ji *et al.*, 2019). Le but de cette étude était d'étudier les effets combinés du DON et de la ZEN sur les cellules IPEC-J2 (cellules intestinales porcines épithéliales du jéjunum immortalisées) et d'examiner les effets protecteurs de Sel-Plex et Mycosorb A+ sur la toxicité induite par DON + ZEN.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Culture cellulaire

Les cellules IPEC-J2 ont été cultivées dans le milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) et le mélange de nutriments F12 de Ham (Sigma-Aldrich) complété par 10 % de sérum porcin inactivé par la chaleur (Sigma-Aldrich) et 1 % de streptomycine pénicilline (Sigma-Aldrich) à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂ (Culture DMEM F12).

1.2. Préparation de Sel-Plex et Mycosorb A+

Une digestion enzymatique a été effectuée sur la levure enrichie en sélénium Sel-Plex (SeY) et Mycosorb A+ (My-A+), une paroi interne de levure associée à des algues de souche *Aurantiochytrium limacinum* (obtenu auprès d'Alltech Inc., Nicholasville, KY, Etats-Unis) pour imiter la digestion gastrique. La digestion a été adaptée d'une technique *in vitro* en trois étapes de Boisen et Fernandez (1997). La concentration de sélénium du digestat Sel-Plex a été déterminée par ICP-OES (Spectroscopie d'émission de plasma à couplage inductif).

1.3. Mesure de la viabilité cellulaire

Les cellules ont étéensemencées dans une plaque noire à fond plat de 96 puits à 2 x 10⁴ cellules/ml dans la culture DMEM F12 avec 2 % de sérum porcin. Pour l'analyse impliquant SeY et / ou My-A +, les cellules ont été incubées avec la préparation de SeY

(0,4 mg/kg de Se) et du My-A+ (2 g / kg) ou les deux pendant 48 h. Les cellules ont été exposées à diverses concentrations de ZEN et DON et incubées pendant 24 ou 48 heures.

1.4. Mesure de l'apoptose avec le test TUNEL

Les cellules ont été pré-incubées avec SeY et / ou My-A+ pendant 48 heures suivies d'une incubation de 24 heures avec ZEN et DON. Les cellules ont ensuite été trypsinées, fixées avec 4 % de paraformaldéhyde dans du PBS, puis stockées dans 70 % d'éthanol à -20 °C pendant au moins 18 h. Le test TUNEL a ensuite été effectué selon les instructions du fabricant (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, États-Unis).

1.5. Mesure des cassures de l'ADN par l'essai COMET

Les cellules ont été pré-incubées avec les produits pendant 48 heures suivies d'une incubation de 24 heures avec ZEN et DON. Les cellules ont été associées avec de l'agarose à bas point de fusion et placées sur une lame COMET (Trevigen, Gaithersburg, États-Unis). L'essai COMET a été réalisé selon le protocole décrit par Lynch *et al.* (2018). Le pourcentage d'intensité de la queue a été noté à l'aide du logiciel Comet Score (TriTek Corp, Summerduck, VA, États-Unis). Les scores individuels pour chacune des 50 comètes ont été additionnés et une valeur moyenne pour chaque traitement a été calculée.

2. RESULTATS

2.1. SeY et My-A+ présentent des effets protecteurs contre la cytotoxicité induite par DON + ZEN

Un effet protecteur significatif contre la cytotoxicité combinée de DON + ZEN a été observé sur les cellules IPEC-J2 incubées 48 heures avant l'exposition aux mycotoxines. Cet effet a été observé dans les différentes combinaisons testées (Cellules incubées avec SeY et/ou My-A+ mis en présence de DON+ZEN). SeY et My-A+ ont tous deux présenté un niveau similaire d'atténuation contre la toxicité induite par DON + ZEN.

2.2. SeY et My-A+ présentent des effets protecteurs contre les dommages à l'ADN induits par DON + ZEN

L'effet protecteur de SeY et My-A+ contre les dommages induits par la combinaison de ZEN et de DON a été analysé. La concentration plus faible de ZEN n'a induit ni lésion de l'ADN ni apoptose, les effets protecteurs de Sel-Plex et de Mycosorb A+ ont été évalués uniquement avec la concentration plus élevée de ZEN de 25 mg/kg. La pré-incubation des cellules avec SeY et My-A+ avant l'exposition au DON + ZEN a entraîné une réduction des dommages à l'ADN (Figure 1). Cela a été mesuré par la réduction significative du pourcentage d'ADN dans la queue dans les cellules traitées avec SeY et/ou My-A+.

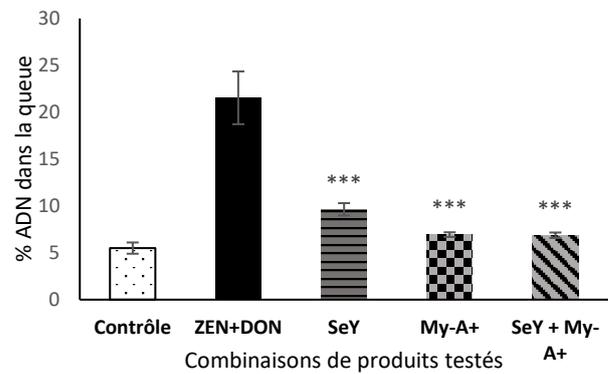


Figure 1 – Effets des produits sur les dommages ADN aux cellules IPEC-J2 après exposition à 0,9 mg/kg ZEN+ 25 mg/kg DON

Données du diagramme à barres présentées comme la moyenne de l'écart-type médian des échantillons. Les différences significatives entre les cellules sont mises en évidence par l'ANOVA suivie du test de Dunnett (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

2.3. SeY et My-A+ atténuent l'apoptose induite par DON+ZEN dans les cellules IPEC-J2

Le test TUNEL a montré que le prétraitement des cellules avec SeY et My-A+ entraînait l'atténuation de l'apoptose induite par DON + ZEN. Une augmentation des valeurs négatives de TUNEL a été observée dans les échantillons ayant subi le prétraitement. Les cellules traitées avec DON + ZEN sans prétraitement avaient une valeur TUNEL négative de 74,8 %. Les cellules prétraitées avec SeY, My-A+ et SeY plus My-A+ avaient respectivement une valeur TUNEL négative de 82,5 %, 81,2 % et 80,5 %. L'augmentation de la valeur négative de TUNEL montre la diminution de l'apoptose dans les cellules pré-incubées avec les produits. Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules traitées avec SeY et/ou My-A+.

CONCLUSION

Les tests de viabilité cellulaire de Comet et de TUNEL ont tous montré que SeY et My-A+ pouvaient atténuer la toxicité induite par les mycotoxines combinées. Avec le test de viabilité cellulaire, une cytotoxicité réduite a été observée dans les cellules prétraitées avec les deux produits. Cela a été observé avec les combinaisons DON et ZEN testées (0,9 mg/kg DON avec 0,25/25 mg/kg ZEN). Le test de Comet a montré une diminution du pourcentage d'ADN de la queue des cellules qui ont subi le prétraitement avec SeY et My-A+ par rapport à celles qui ne l'ont pas eu. Cette étude montre que le prétraitement avec SeY et My-A+ a permis d'atténuer in vitro les effets combinés du DON et de la ZEN.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boisen, S., and J. A. Fernández. 1997. Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by in vitro analyses. *Anim Feed Sci Technol*, 68, 277-286
- Ji, J.; Wang, Q., Wu, H., Xia, S., Guo, H., Blaženović, I., Zhang, Y., Sun, X. 2019. Insights into Cellular Metabolic Pathways of the Combined Toxicity Responses of Caco-2 Cells Exposed to Deoxynivalenol, Zearalenone and Aflatoxin B1. *Food Chem Toxicol*, 126, 106-112.
- Lynch, S. Horgan, K. Walls, D. White, 2018. B Selenised yeast sources differ in their capacity to protect porcine jejunal epithelial cells from cadmium-induced toxicity and oxidised DNA damage. *Biomaterials*, 31, 845-858.
- Liew, W.P.P., Mohd-Redzwan, S. 2018. Mycotoxin: Its Impact on Gut Health and Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol*. 8, 60.
- Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I., Tabuc, C., Nicolau, A., Aprodu, I., Puel, O., Oswald, I. P. 2012 Current Situation of Mycotoxin Contamination and Co-Occurrence in Animal Feed-Focus on Europe. *Toxins*, 4, 788-809.