



42^{ème} Journée de la Recherche Équine
Jeudi 17 mars 2016

Potentiel toxigène de souches de *Stachybotrys* issues de fourrages

S. Bailly¹, S. Roussel², B. Aleksic¹, M. Lacroix³, JD. Bailly¹

¹ Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Equipe Biosynthèse et Toxicité des mycotoxines, UMR Toxalim, 23 chemin des capelles, 31076 Toulouse cedex

² Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Besançon, 3 boulevard Flemming, 25030 Besançon cedex

³ Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Plateforme AXIOM, UMR Toxalim, 23 chemin des capelles, 31076 Toulouse cedex

jd.bailly@envt.fr

Résumé

Stachybotrys chartarum est une moisissure capable de se développer dans les fourrages en cas de réhumidification pendant le stockage. Cette espèce est connue comme potentiellement capable de produire plusieurs mycotoxines appartenant à la famille des trichothécènes macrocycliques. Les équidés sont particulièrement sensibles à ces composés et, depuis quelques années, nous avons noté une augmentation des suspicions d'intoxications équinés. Dans ce contexte, notre travail avait pour objectif d'identifier des souches de *Stachybotrys* issues de fourrages et de caractériser leur potentiel toxigène.

Nous avons démontré que parmi les souches de *Stachybotrys* contaminant les fourrages, environ 40% sont des souches de *Stachybotrys chartarum*. Nous avons aussi montré qu'une proportion importante de ces souches est très fortement toxigène et capable de produire plusieurs trichothécènes macrocycliques en grande quantité lorsque les conditions sont favorables. La proportion relative des différentes toxines produites est variable en fonction des souches.

Mots clés : *Stachybotrys*, Fourrage, Trichothécènes macrocycliques

Summary

Stachybotrys chartarum is a fungus able to grow on fodders in case of moistening during storage. This species is known to be potentially able to produce simultaneously several toxins belonging to the macrocyclic trichothecene family. Equines are especially sensitive to these compounds and, for several years, we noted an increasing number of animal poisoning related to these mycotoxins. Within this context, our work aims to identify *Stachybotrys* isolates from fodders and to characterize their toxigenic potential.

We demonstrated that, among *Stachybotrys* isolates contaminating fodders, about 40% belong to *S. chartarum* species. We also showed that a high proportion of these strains was highly toxigenic and able to produce high levels of macrocyclic trichothecenes when culture conditions are favorable. The relative proportion of the different toxins can vary according to the strain.

Key-words: *Stachybotrys*, Fodders, Macrocyclic trichothecenes



Introduction

Les fourrages secs jouent un rôle fondamental dans l'alimentation des équidés. Cependant, ces matières premières peuvent, dans certains cas, être contaminées par des mycotoxines dangereuses pour la santé des animaux exposés.

En effet, la flore fongique des foins est complexe. Elle est constituée d'espèces fongiques contaminant les plantes au champ et d'autres capables de se développer plus tard, au cours du stockage, notamment en cas de réhumidification. Ainsi, les foins peuvent permettre le développement de certaines espèces fongiques toxigènes dont le pouvoir cellulolytique important leur permet de coloniser ces substrats pauvres en nutriments facilement assimilables mais riches en cellulose (Buckley *et al.*, 2007).

Parmi les espèces fongiques fréquemment isolées des fourrages, l'espèce la plus importante sur le plan sanitaire est certainement *Stachybotrys chartarum*. Cette moisissure dont le réservoir naturel est le sol peut se développer sur les fourrages dont elle est capable d'utiliser la cellulose comme source de glucides. Elle peut produire plusieurs toxines appartenant à la famille des trichothécènes macrocycliques. L'effet de ces composés a initialement été décrit à l'occasion d'accidents toxiques chez les animaux, et plus particulièrement dans l'espèce équine qui semble être la plus sensible à ces composés (Le Bars, 1977). Dans cette espèce, les toxines de *Stachybotrys chartarum* peuvent entraîner des intoxications dont les symptômes varient de la simple baisse des performances sportives (refus de l'effort, refus de l'obstacle) à la mort brutale des animaux, sans signe avant-coureur (Benazzou *et al.*, 1991 ; Lefebvre *et al.*, 1994 ; Le Bars *et al.*, 1996 ; Bailly *et al.*, 2010). A l'heure actuelle, on ne connaît pas l'origine précise de ces symptomatologies variées. Elles pourraient résulter de concentrations différentes en toxines dans les fourrages ou encore de la présence de mélanges différents de toxines (variation dans les proportions des trichothécènes produits en fonction des souches et/ou des conditions environnementales).

Depuis quelques années, une augmentation très sensible du nombre d'intoxications équine à ces mycotoxines a été notée (Bailly *et al.*, 2010). L'espèce équine pouvant, de par sa sensibilité, être considérée comme une espèce sentinelle, ce constat traduit certainement une augmentation de la fréquence de contamination des foins. Ceci est en accord avec les résultats de travaux récents ayant mis en évidence la présence récurrente de *Stachybotrys chartarum* dans des bioaérosols prélevés dans des exploitations agricoles en France (Lanier *et al.*, 2012). Cette augmentation de la prévalence de ce contaminant dans les environnements agricoles pourrait résulter des changements climatiques et des conditions défavorables de récolte des foins. Elle pourrait aussi être liée à une modification des pratiques agricoles et à la généralisation de l'usage de grosses balles de plusieurs centaines de kilogrammes, laissées sans protection dans les champs et donc beaucoup plus exposées à des réhumidifications successives pendant la durée de stockage.

A l'heure actuelle, en l'absence de dosage en routine des toxines produites par *Stachybotrys*, l'implication des mycotoxines produites par cette moisissure dans les pathologies observées chez les chevaux repose sur la mise en évidence, dans les fourrages suspects, de ce micro-organisme. Cependant, des études antérieures réalisées sur des souches de *Stachybotrys* isolées d'autres substrats que les fourrages ont montré que le potentiel toxigène des souches de cette espèce fongique pouvait grandement varier.

Par conséquent, l'évaluation du risque associé à la contamination d'un fourrage par une souche de *Stachybotrys chartarum* nécessite d'être en mesure de caractériser le potentiel toxigène de cette souche.

Dans ce contexte, l'objectif général de nos travaux était de caractériser les espèces de *Stachybotrys* pouvant contaminer les fourrages et d'étudier leur capacité à produire des mycotoxines (=potentiel toxigène).

Pour cela, 21 souches issues de fourrages impliqués dans des accidents toxiques équine ou isolées à l'occasion de contrôles qualité ont été identifiées par analyse morphologique comme précédemment décrit pour les souches pouvant contaminer les environnements intérieurs (Andersen *et al.*, 2003). Ces analyses seront complétées d'une analyse moléculaire basée sur le séquençage des ITS et du gène Tri 5.

Le potentiel toxigène de ces isolats a été déterminé en utilisant une méthode de quantification des principaux trichothécènes macrocycliques (Satratoxines G et H, Roridine L2, Verrucarine J) basée sur la séparation et la quantification des molécules par UPLC-MS-MRM.

1 Matériel et méthodes

1.1 Souches fongiques

Vingt et un isolats fongiques ont été analysés. Ils ont été isolés à partir de foins ou pailles. L'origine précise des souches est récapitulée dans le tableau 1. Parmi ces souches, certaines étaient suspectes d'être impliquées dans des accidents toxiques chez des équidés alors que d'autres ont été isolées à l'occasion de contrôles qualité des fourrages. Toutes les souches sont conservées au laboratoire sur milieu gélosé MEA et



régulièrement repiquées pour en vérifier la viabilité. La souche Lyd07 est une souche qui avait été préalablement isolée par Le Bars et coll. (1977) puis lyophilisée.

1.2 Identification morphologique

L'identification morphologique des espèces de *Stachybotrys* a été réalisée selon Andersen *et al.* (2003). Les souches ont été inoculées en 3 points sur milieu PDA, CMA et CYA et incubée 10 jours à 25°C. L'analyse macro- et microscopique des cultures a été réalisée à partir des cultures sur PDA. La production de pigment a, elle, été évaluée après croissance sur CMA et CYA. Enfin, la taille des colonies a été mesurée sur les cultures CMA. En effet, sur les 3 milieux utilisés, *S. chartarum* se développe plus vite que *S. chlorohalonata* (diamètre des colonies supérieur après 10j de culture) ; *S. chlorohalonata* produit un pigment spécifique vert sur CYA et orangé sur CMA. Enfin, au plan microscopique, les spores de *S. chartarum* ont une forme elliptique alors que celles de *S. chlorohalonata* sont ovoïdes. Cette identification morphologique a été complétée d'une identification moléculaire.

1.3 Identification moléculaire

L'identification moléculaire des souches a été réalisée après culture sur milieu Sabouraud pendant 7 jours. Environ 25 mm² de culture ont été extraits à l'aide d'un kit DNeasy plante (Qiagen), selon les recommandations du fabricant. L'identification a été réalisée par séquençage, pour chacun des isolats des gènes codants pour la Trichodiène synthase (Tri5) et une partie de l'ADN ribosomal (ITS) après amplification des séquences par PCR (Cruse *et al.*, 2002 ; Koster *et al.*, 2009).

1.4 Quantification des trichothécènes macrocycliques par HPLC-MS/MRM

Afin de caractériser le potentiel toxigène des souches étudiées, 100 µl d'une suspension calibrée de spores (10⁵ spores) ont été cultivés sur PDA pendant 14j à 25°C à l'obscurité. Ensuite, 10g de matériel de culture ont été extraits par le PBS (Phosphate Buffered Saline) pour le dosage de la roridine L2 et de la verrucarine J ou par le chloroforme pour le dosage des satratoxines G et H. Les extraits ont ensuite été centrifugés (4500 tours/min pendant 5 minutes), filtrés sur filtre séparateur de phase, 8 ml ont été évaporés à sec et repris dans 2 ml d'un mélange acétonitrile-eau (2 :1).

La quantification des trichothécènes macrocycliques a été réalisée en utilisant une chaîne UPLC Acquity couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle Xevo et un détecteur PDA Acquity (Waters). Les toxines ont été séparées sur une colonne Acquity BEH C18 (2,1 x 100 mm ; 1,7 µm ; Waters) en utilisant un gradient Acétonitrile/eau. Les échantillons ont été ionisés en mode positif (ESI+). Les résultats chromatographiques ont été traités en utilisant le logiciel Targetlynx (Waters). La quantification des 4 trichothécènes testés (Satratoxines G et H, Roridine L2 et Verrucarine J) a été réalisée par comparaison avec une gamme étalon de chacune des toxines pures (don du Prof. JJ Pestka, Université du Michigan, USA).

2 Résultats et discussion

2.1 Identification des souches de *Stachybotrys* issues de fourrage

L'identification morphologique des souches a été réalisée selon les travaux d'Andersen en ensemencant les isolats sur différents milieux de culture permettant de différencier les 2 principales espèces de *Stachybotrys* : *S. chartarum* et *S. chlorohalonata*.

Sur les 21 souches étudiées, 9 ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *Stachybotrys chartarum* et 11 comme des isolats de *Stachybotrys chlorohalonata* (tableau 1).

Une seule souche a donné un résultat difficile à interpréter, tant en ce qui concerne l'identification morphologique que l'identification moléculaire. En effet, la souche ST32 présente des caractéristiques morphologiques intermédiaires rendant son identification difficile : la colonie a un diamètre intermédiaire, la souche produit un pigment comme *S. chlorohalonata* mais présente des conidies de forme elliptique comme *S. chartarum*. Au plan moléculaire, les séquences ITS sont en accord avec une souche de *S. chlorohalonata* alors que la séquence du gène Tri 5 correspond à une souche de *S. chartarum*. Des analyses complémentaires sont en cours pour finaliser l'identification de cette souche.

Il ressort de ces résultats que, dans les fourrages, on trouve une proportion quasi-équivalente de souches de *S. chartarum* et de *S. chlorohalonata*. Il s'agit de la première étude rapportant la prévalence relative de ces 2 espèces fongiques dans les fourrages. Cependant, il convient de noter que ces résultats sont différents des observations réalisées dans les maisons. En effet, *Stachybotrys* est aussi un contaminant fréquent des maisons, en particulier ayant subi un dégât des eaux car ce contaminant peut alors se développer sur les

papiers peints humides. Dans les enquêtes réalisées sur ce type de contamination, la proportion de souches de *Stachybotrys chartarum* est plus élevée et atteint 80% des isolats (Andersen *et al.*, 2003).

Tableau 1 : identification des souches de *Stachybotrys* issues de fourrages
Table 1: identification of Stachybotrys strains isolated from fodders

Souche	Origine	Diamètre colonie (mm)	Pigment Sur CYA	Forme des spores	Identification morphologique	Identification moléculaire
ST81	Foin	56	-	E	Sa	Sa
ST82	Paille	47	-	E	Sa	Sa
ST90	Foin	55	-	E	Sa	Sa
ST129a	Foin	51	-	E	Sa	Sa
ST129b	Foin	50	-	E	Sa	Sa
ST141	Foin	50	-	E	Sa	Sa
ST164a	Paille	54	-	E	Sa	Sa
ST360cv	Foin	50	-	E	Sa	Sa
Lyd07	Paille	52	-	E	Sa	Sa
ST32	Foin	45	Jaune-vert	E	?	?
ST51	Foin	36	+	O	So	So
ST66	Paille	36	+	O	So	So
ST80	Foin	39	+	O	So	So
ST91	Bois	36	+	O	So	So
ST103	Foin	36	+	O	So	So
ST124	Foin	33	+	O	So	So
ST127	Feuilles	40	+	O	So	So
ST128	Herbe morte	42	+	O	So	So
ST142	Foin	36	+	O	So	So
ST150	Foin	37	+	O	So	So
ST164b	Paille	40	+	O	So	So

Sa : *S. chartarum* ; So : *S. chlorohalonata*

E: spores de forme elliptique; O: spores de forme ovoïde

2.2 Potentiel toxigène des souches de *Stachybotrys* issues de fourrage

Le potentiel toxigène des isolats a été caractérisé par UPLC-MS/MRM et les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 2.

Ces résultats montrent que 8 souches de *S. chartarum* sont très fortement toxigènes. Elles produisent en effet de grandes quantités des 4 trichothécènes macrocycliques analysés. Pour toutes ces souches, c'est la roridine L2 qui est produite en plus grande quantité. La proportion relative des autres toxines peut varier. Quatre souches produisent plus de verrucarine J que de satratoxines, 3 souches produisent plus de satratoxines que de verrucarine J et enfin 1 souche produit des quantités équivalentes de ces toxines. Ces différences pourraient peut-être expliquer la grande variabilité des symptômes rapportés chez les animaux exposés à des fourrages contaminés. En effet, tous les trichothécènes macrocycliques n'ont pas la même toxicité et il a été démontré que les satratoxines G et H étaient plus toxiques que les autres composés de cette famille (Islam *et al.*, 2009)

Seule 1 souche identifiée comme *S. chartarum* apparaît comme faiblement toxigène et n'a produit que de la roridine L2 en faible quantité.

Toutes les souches de *Stachybotrys chlorohalonata* ont été capables de produire de la roridine L2, composé dont la toxicité est cependant inférieure à celle des satratoxines (Islam *et al.*, 2009).

Cette étude décrit pour la première fois le potentiel toxigène de souches de *Stachybotrys* issues de fourrages. Si on compare ces résultats avec les données disponibles sur le potentiel toxigène des souches isolées dans les maisons, on se rend compte que la proportion de souches de *Stachybotrys chartarum* toxigènes est beaucoup plus importante dans les fourrages. En effet, 80% des souches étudiées ici se sont avérées fortement productrices de trichothécènes macrocycliques alors que pour les isolats issus d'environnements intérieurs, moins de 40% des souches sont toxigènes, les différences méthodologiques pour la culture et la mesure des toxines rendant difficile la comparaison des niveaux de toxines produites (Andersen *et al.*, 2003).



Tableau 2 : potentiel toxigène des souches de *Stachybotrys*
Table 2: *toxigenic potential of Stachybotrys stains*

Souche	identification	RL2*	VJ*	SG*	SH*
ST81	Sa	40	-	-	-
ST82	Sa	45 112	17 379	8 120	1 727
ST90	Sa	48 719	25 975	49 581	12 491
ST129a	Sa	44 479	8 387	3 118	1 303
ST129b	Sa	32 128	5 412	1 479	250
ST141	Sa	24 694	4 058	1 031	698
ST164a	Sa	19 995	5 284	4 902	368
ST360cv	Sa	60 780	4 104	596	12 720
Lydo7	Sa	50 624	5 260	27 065	26 214
ST32	?	296	-	-	-
ST51	So	92	-	-	-
ST66	So	115	-	-	-
ST80	So	78	-	-	-
ST91	So	199	-	-	-
ST103	So	61	-	-	-
ST124	So	156	-	-	-
ST127	So	108	-	-	-
ST128	So	75	-	-	-
ST142	So	208	-	-	-
ST150	So	115	-	-	-
ST164b	So	62	-	-	-

Sa : *S. chartarum* ; So : *S. chlorohalonata* ; RL2 : roridine L2 ; VJ : verrucarine J ; SG : satratoxine G ; SH : satratoxine H

* : valeurs exprimées en ng/g de matériel de culture

Notre étude montre aussi que des souches de *S. chlorohalonata* peuvent produire de la roridine L2. En effet, il était classiquement admis jusqu'à présent que ces souches n'étaient pas capables de produire des trichothécènes macrocycliques. Il est probable que ce résultat soit directement lié aux procédures d'extraction utilisées dans notre étude ainsi qu'à la sensibilité de la méthode analytique développée.

Conclusion

Notre étude a montré pour la première fois que les fourrages pouvaient être fréquemment contaminés par des souches fortement toxigènes de *S. chartarum*. Cette contamination peut avoir des conséquences directes sur la santé animale et entraîner l'apparition d'intoxications aiguës chez les équidés, espèce très sensible aux mycotoxines produites par cette espèce fongique. Ces résultats obtenus sur milieu de culture doivent maintenant être confirmés sur fourrages. Le développement d'une méthode analytique performante rend ces études désormais possibles.

La mise en évidence de la présence de souches fortement toxigènes de *Stachybotrys* dans les fourrages soulève aussi d'autres questions importantes :

- Quel peut être l'effet de la présence de ces contaminants sur les personnes qui manipulent des fourrages contaminés ? En effet, les satratoxines sont connues pour leur effet dermo-nécrosant et il est donc possible que la manipulation de fourrages contaminés entraîne l'apparition de troubles cutanés. On peut aussi se poser la question du risque d'inhalation de particules contaminées par ces toxines lors de la manipulation et du brassage des fourrages.

- Comment limiter le développement de ces contaminants pendant le stockage des fourrages ? *Stachybotrys* est un genre fongique hygrophile dont le développement est lié à une réhumidification soit précoce, au champ, soit plus souvent pendant le stockage des fourrages secs. Les conditions climatiques rencontrées depuis plusieurs années et les changements dans les modalités de préparation des fourrages pourraient expliquer l'augmentation de la fréquence des intoxications animales liées à ces toxines. Il convient donc de sensibiliser les éleveurs à cette problématique afin qu'ils soient particulièrement vigilants aux conditions de stockage des fourrages.



Remerciements

Les auteurs remercient le Professeur Pestka (Université du Michigan) pour la fourniture des standards de trichothécènes macrocycliques.

Ce travail a été financé par l'Ifce (projet Genstachytox) et l'ANSES (Projet Aerostachytox).

B. Aleksic bénéficie d'une bourse doctorale de l'ADEME et du CSTB (Centre Scientifique et Technique du Bâtiment).

Références

- Andersen, B., Nielsen, KF., Jarvis, BB. 2003. Characterization of *Stachybotrys* from water damaged buildings based on morphology, growth and metabolite production. *Mycologia*, 94, 392-403.
- Bailly, S., Querin, A., Guerre, P., Bailly, JD. 2010. Stachybotriotoxicosis: a topical mycotoxicosis in France. *Proceedings from 36th equine research days*, 221-223.
- Benazzou, H., Kichou, F., Abidi, M., Ouragh, L., El Haleq, A., Tber, A. 1997. Equine Stachybotryotoxicosis: first outbreak in Morocco – autumn 1991. *Prat. Vet. Equine*, 29, 15-23.
- Buckley, T., Creighton, A., Fogarty, U. 2007. Analysis of Canadian and Irish forage, oats and commercially available equine concentrate feed for pathogenic fungi and mycotoxins. *Ir Vet. J.*, 60, 231-236.
- Cruse, M., Telerant, R., Gallagher, T., Lee, T., Taylor, JW. 2002. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia*, 94, 814-822.
- Islam, Z., Shinozuka, J., Harkema, J.R. and Pestka, J.J., 2009. Purification and comparative neurotoxicity of the trichothecenes satratoxin G and roridin L2 from *Stachybotrys chartarum*. *J Toxicol. Environ. Health. Part A* 72(20): 1242–1251.
- Koster, B., Wong, B., Straus, N., Malloch, D. 2009. Multi-gene phylogeny for *Stachybotrys* evidences lack of trichodiene synthase (tri 5) gene for isolates of one of the three intrageneric lineages. *Micol. Res.*, 113, 877-886.
- Lanier, C., Andre, V., Seguin, V., Heutte, N., El Kaddoumi, A., Bouchart, V., Picquet, R., Garon, D. 2012. Recurrence of *Stachybotrys chartarum* during mycological and toxicological study of bioaerosols collected in a dairy cattle shed. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 19, 61-67.
- Le Bars, J., Gerard, JP., Michel, C. 1977. Mise en évidence de la Stachybotryotoxicose en France: un cas d'intoxication aiguë chez des daims. *Annal. Nutr. Alim.*, 31, 509-517.
- Le Bars, J., Le Bars, P. 1996. Recent acute and subacute mycotoxicoses recognized in France. *Vet. Res.*, 27, 383-394.
- Lefebvre, HP., Le Bars, J., Legrand, C., Le Bars, P., Dossin, O., Toutain, PL., Braun JP. 1994. Three cases of equine Stachybotryotoxicosis. *Rev. Med. Vet.*, 145, 267-269.