

Toxinogénèse de *Stachybotrys chartarum* : comparaison du potentiel toxigène de souches issues de contextes épidémiologiques différents

Par :

- S. Bailly¹, D.M. Votion², S. Roussel³ et JD. Bailly¹
- ¹Immuno-Mycotoxicologie, UMR 1331 Toxalim, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 chemin des capelles, 31076 Toulouse cedex, France
- ² Pôle équin, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, 4000 Liège, Belgique
- ³ UMR Chrono-environnement, Université de Franche Comté, 25000 Besançon

Résumé

Stachybotrys chartarum est une moisissure tellurique capable de coloniser les fourrages. Elle peut produire pendant son développement certaines mycotoxines appartenant à la famille des trichothécènes macrocycliques. Les équidés sont particulièrement sensibles à ces molécules qui induisent des troubles variés, allant de la mort rapide à la réduction des performances sportives en passant par des troubles cutanéomuqueux. L'origine de cette variabilité des symptômes n'est pas connue : elle pourrait résulter de niveaux de contamination variables des fourrages et/ou de la synthèse de mélanges différents de mycotoxines.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les conditions favorisant la toxinogénèse de *Stachybotrys chartarum* (temps, milieu, température) puis, comparé le potentiel toxigène de 10 souches de *Stachybotrys chartarum* issues de contextes épidémiologiques différents.

Cette étude montre que les souches de *Stachybotrys* présentent des potentiels toxigènes extrêmement variables, certaines souches impliquées dans des accidents toxiques étant capable de produire de grandes quantités de toxines.

Mots clés : *Stachybotrys chartarum*, toxinogénèse, substrat, température

Summary

Stachybotrys chartarum is a telluric mould able to colonize fodders. It can produce during its growth some mycotoxins that belong to the family of macrocyclic trichothecenes. Equines are sensitive to these contaminants that lead to various clinical signs, going from rapid death to decrease of sporting ability or cutaneous lesions. The origin of such variable symptoms is not known: it may result form variable levels of contamination of fodders and/or the presence of different mixture of toxins.

In a first step, we characterized the conditions that favour toxinogenesis of *Stachybotrys chartarum* (time, medium, temperature) then compared the toxigenic potential of 10 strains coming form different epidemiological contexts.

Our study demonstrated that *Stachybotrys chartarum* strains display highly variable toxigenic profiles, some strains involved in toxic accident being able to produce very high amounts of toxins.

Key-words: *Stachybotrys chartarum*, toxinogenesis, substrate, temperature

Introduction

Certains contaminants de l'environnement peuvent altérer les performances sportives des chevaux en modifiant le bon fonctionnement musculaire. Parmi ces contaminants, le *Stachybotrys chartarum* est un champignon microscopique pouvant contaminer les fourrages (AFSSA, 2009). Au cours de son développement, cette moisissure peut produire des métabolites toxiques appartenant à la famille des trichothécènes.

L'exposition des animaux au *Stachybotrys chartarum* peut entraîner l'apparition de troubles aigus pouvant aller jusqu'à la mort brutale en quelques heures. Ces dernières années, la moisissure a aussi été mise en évidence dans un nombre croissant de contrôles effectués sur des aliments de chevaux qui présentaient une baisse inexplicable des performances sportives (Bailly *et al.*, 2010). Très souvent, ces symptômes sont associés à une élévation des créatinines kinases, marqueur d'une souffrance musculaire (Servantie *et al.*, 1985 ; Le Bars *et al.*, 1996 ; Benazzou *et al.*, 1997). Notre projet avait donc pour objectif de caractériser et comparer la capacité de production de mycotoxines de différentes souches de *Stachybotrys* isolées (1) à partir d'aliments impliqués dans des accidents toxiques aigus, (2) de fourrages responsables de baisses de performances sportives ou (3) lors de simples contrôles qualité de fourrages non responsables de troubles perceptibles afin de mettre en relation le contexte épidémiologique et la toxogénèse des différentes souches.

1. Matériel et méthodes

1.1. Souches fongiques

Les souches de *Stachybotrys* utilisées pour cette étude ont été isolées au laboratoire à partir de fourrages suspects d'être impliqués dans des épisodes de stachybotriotoxicose équine aiguë ou subaiguë ou lors de contrôles qualité effectués sur des fourrages (à l'achat ou après stockage). L'identification du genre puis de l'espèce a été réalisée par mise en évidence de différentes caractéristiques macro et microscopiques (Jong et Davis, 1976). L'identification morphologique a ensuite été confirmée par séquençage du gène Tri 5, codant pour la trichothécène synthase, et des ITS (Roussel *et al.*, 2011).

1.2. Détermination des conditions optimales de toxogénèse

L'analyse de l'influence du substrat, de l'activité hydrique, de la température et du temps sur la synthèse de trichothécènes macrocycliques a été réalisée en utilisant une souche de *Stachybotrys chartarum* isolée à partir d'une paille impliquée dans une suspicion d'intoxication équine (souche ST82).

1.2.1. Mise en culture

La souche ST 82 a étéensemencée sur milieu gélosé au malt et cultivée pendant 15 jours à 25°C. Ensuite, la boîte a été lavée avec du tween (0,05%) afin de récupérer et dénombrer les spores fongiques. La concentration de la suspension de spores a été ajustée à 10⁶ spores/ml. 100 µl de cette solution ont été utilisés pour l'ensemencement des différents milieux. 5 milieux de culture ont été testés : milieux gélosés au malt et PDA (Potato Dextrose Agar), milieu liquide YES (Yeast Extract Sucrose), orge et riz. Après ensemencement, les milieux ont été placés à l'étuve à 18, 25 ou 32°C pendant 4 semaines. Chaque semaine, 3 boîtes de chaque condition expérimentale ont été prélevées. Un contrôle morphologique macro et microscopique a été systématiquement réalisé à chaque prélèvement.

1.2.2. Mesure de l'ergostérol

L'ergostérol, constituant de la paroi des moisissures et biomarqueur du développement fongique, a été mesuré en utilisant la méthode développée au sein du laboratoire et précédemment décrite (Bailly *et al.*, 1999). La quantification de l'ergostérol est réalisée par fluorodensitométrie après séparation par chromatographie planaire et chauffage des plaques à 130°C pendant 30 min.

1.2.3. Quantification des trichothécènes macrocycliques

La quantification des trichothécènes macrocycliques a été réalisée en utilisant un Kit ELISA « Quantitox for Trichothecenes » (Enviroligix Inc, USA) comme préconisé par le fabricant. Ce kit permet la quantification simultanée de 10 trichothécènes macrocycliques (Satratrotoxine G, H, Isosatratrotoxine F, Roridine A, E, H, Verrucarol, Verrucarine A et J) par lecture en spectrophotométrie à 450 nm (Statfax, 303 reader plus) (Charpin-Kadouch *et al.*, 2006). La limite inférieure de détection du kit est de 0,14ppb

et la limite supérieure de quantification de 18 ppb. Les échantillons ont été dilués si besoin afin que les teneurs mesurées soient situées dans la gamme de quantification du kit.

1.3. Comparaison des profils toxigènes des souches

Les 10 souches ont été cultivées dans les conditions identifiées comme optimales à la toxinogénèse après les études précédentes. Ainsi, 10^5 spores de chacune des souches ont été utilisées pour ensemercer un milieu orge incubé pendant 4 semaines à 25°C. Les trichothécènes macrocycliques produits par les différentes souches utilisées ont été extraits et quantifiés comme décrit précédemment.

2. Résultats et discussion

2.1. Croissance de *Stachybotrys* en fonction du milieu et de la température

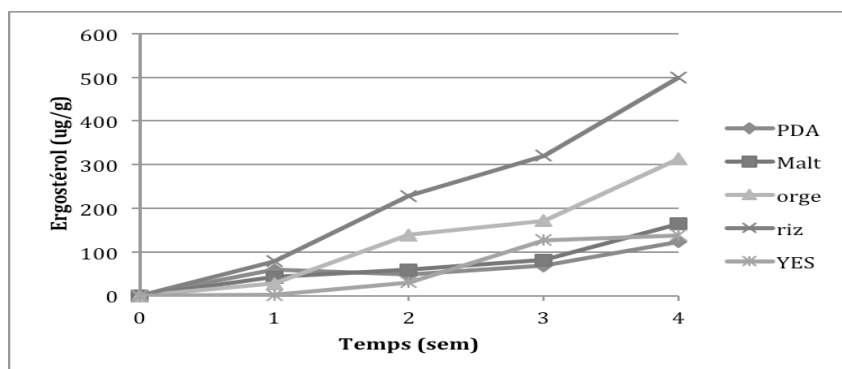
L'analyse de l'évolution de la teneur en ergostérol (Figure I) montre que l'orge et le riz sont des milieux de culture plus favorable que les 3 autres pour la croissance fongique. Le milieu YES est quant à lui peu favorable à la croissance de cette espèce fongique et les teneurs en ergostérol y ont été systématiquement inférieures à celles observées dans les autres milieux.

La comparaison des résultats obtenus avec les trois températures de culture montre que :

- *Stachybotrys chartarum* se développe de façon rapide à 25 et 32°C. A 32°C la croissance est plus rapide mais le plateau de développement est vite atteint. A 25°C, la teneur en ergostérol continue d'augmenter entre 3 et 4 semaines de culture.
- Le passage à 18°C ralentit très fortement la croissance fongique dans tous les milieux testés.

Figure I : Evolution de la teneur en ergostérol à 25°C en fonction du substrat. Les résultats représentent les moyennes de 3 essais +/- écarts types

Figure I : Variation of ergosterol content as a function of substrate. Results are means of 3 assays +/- sd



2.2. Toxinogénèse en fonction du milieu et de la température

La production de mycotoxines étant généralement observée dans des conditions proches des conditions de croissance optimales (métabolisme secondaire), une quantification de la production des trichothécènes macrocycliques a été réalisée pour chaque optimum de croissance observé (couple milieu/température). L'ensemble des résultats obtenus est récapitulé dans le tableau 1.

Tableau 1 : Quantification des trichothécènes macrocycliques produits par la souche ST82 sur les substrats testés à 3 températures. Les résultats sont exprimés en μg équivalent roridine A/ml de surnageant (ppb).

Table 1: Quantification of Trichothecenes produced by ST82 strain on substrates at 3 temperatures. Results are expressed as μg equivalent roridin A/ml of supernatant (ppb)

Milieu	Température (temps)		
	18°C	25°C	32°C
Malt	19400 (2 sem)	162500 (4 sem)	1250 (2 sem)
PDA	37000 (2 sem)	108000 (4 sem)	100 (2 sem)
Orge	460000 (4 sem)	470000 (4 sem)	56000 (3 sem)
Riz	24000 (4 sem)	20000 (4 sem)	3000 (3 sem)
YES	25 (4 sem)	125 (3 sem)	2,5 (4 sem)

Il apparaît que, comme attendu, le milieu liquide YES apparaît peu propice à la toxino-génèse.

A 32°C, si la moisissure se développe bien, elle ne produit que des quantités modestes de trichothécènes. Ce résultat est en accord avec les données épidémiologiques car, dans la majorité des

cas, les intoxications ont lieu en automne et au printemps, lorsque les températures sont modérées (Benazzou, 1997 ; Lefebvre *et al.*, 1994). Ces données montrent que les conditions les plus favorables à la toxino-génèse sont 4 semaines de culture sur orge à 25°C.

2.3. Comparaison du potentiel toxigène de souche d'origine différente

La production de trichothécènes macrocycliques mesurée après culture des différentes souches est récapitulée dans le tableau 2. Le potentiel toxigène des souches testées est très variable (de quelques ppb à plusieurs centaines de ppm). Seules les souches de *Stachybotrys chartarum* sont susceptibles de produire de grandes quantités de toxines, en accord avec les travaux antérieurs de Andersen et coll. (2003). Si les souches les plus toxigènes ont été associées à des accidents toxiques chez les animaux (souches ST82 ; ST129 β ; ST164 α), cette relation n'est pas systématique.

Tableau 2 : Origine, identification et potentiel toxigène de 10 souches de *Stachybotrys* différentes après culture à 25°C pendant 4 semaines sur milieu orge.

Table 2: Origin, identification and toxinogenic potential of 10 different strains of *Stachybotrys* after culture at 25°C for 4 weeks on barley

Souches	Origine	Troubles observés	Id°	Trichothécènes (ppb)
ST 51	Foin luzerne	- (Contrôle stock)	So	20
ST 66	Paille	++ (BV)	So	12
ST 81	Foin	+++	Sa	35
ST 82	Paille	+++	Sa	235 000
ST 90	Foin	- (Contrôle stockage)	Sa	392 000
ST 103	Foin	+++	So	340
ST 124	Foin	++	So	28
ST 128	Herbes mortes	+++	So	26
ST 129 β	Foin	+++	Sa	26 500
ST 164 α	Paille	+++	Sa	404 000

Id° = identification ; Sa = *Stachybotrys chartarum* ; So : *Stachybotrys chlorohalonata*

Les souches toxigènes de *S. chartarum* sont parfois susceptibles de produire de grandes quantités de trichothécènes macrocycliques, ce qui peut expliquer leur implication directe dans des accidents toxiques chez les chevaux. Cependant, il ne semble pas y avoir de lien direct entre le potentiel toxigène de la souche et la gravité et/ou la nature des signes cliniques observés. Par exemple, la souche ST82 a été isolée de fourrages suspects d'être responsables de diminution des performances sportives de chevaux de courses alors que la souche ST129 β a été isolée à partir d'aliments ayant entraîné la mort d'animaux. Une analyse plus fine de la nature exacte des trichothécènes produits par ces souches pourrait peut-être permettre de savoir si ces différences sont liées à la quantité de toxine produite dans les conditions de contamination naturelle du fourrage ou bien à la faculté de ces souches à produire des mélanges de toxines dans des proportions différentes.

Remerciements

Ce travail a été soutenu par le Conseil Scientifique de l'Institut Français du Cheval et de l'équitation (Projet Myostach 2011).

Références

- AFSSA, 2009. Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. AFSSA ed., Paris.
- Andersen, B., Nielsen, K.F., Thrane, U., Szaro, T., Taylor, J.W., Jarvis, B.B., 2003. Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata* and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings. *Mycologia*, 95, 1227-1238.
- Bailly, J.D., Le Bars, P., Pietri, A., Benard, G., Le Bars J., 1999. Evaluation of a fluorodensitometric method for analysis of ergosterol as a fungal contamination marker in compound feeds. *Journal of Food Protection*, 62, 686-690.
- Bailly, S., Querin, A., Guerre, P., Bailly, J.D., 2010. La stachybotryotoxicose, une mycotoxicoïse d'actualité en France. 36^{ème} Journées de la recherche équine, Paris.
- Benazzou, H., Kichou, F., Abidi, M., Ouragh, L., El Haleq, A., Tber A. 1997., Stachybotryotoxicose équine : A propos d'une première épizootie au Maroc – Automne 1991. *Pratique Vétérinaire Equine*, 29, 15-23.
- Charpin-Kadouch, C, Maurel, G, Felipe, R, Queralt, J, Ramadour, M, Dumon, H, Garans, M, Botta, A Charpin, D. 2006. Mycotoxin identification in moldy dwellings. *Journal of Applied Toxicology* 26, 475-479.
- Lefebvre HP., Le Bars J., Legrand C., Le Bars P., Dossin O., Toutain PL., Braun JP. 1994. Three cases of equine stachybotryotoxicosis. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 145, 267-269.
- Roussel S., Grenouillet F., Bailly S., Skana L., Millon L, Bailly JD. 2011. Description morphologique et phénotypique de souches de *Stachybotrys* isolées de l'environnement. *Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale*, Strasbourg.