

Incidences des toxines de champignons endophytes des graminées sur les herbivores en conditions européennes

S. BONY (1), J.C. EMILE (2), A. DURIX (1), C. RAVEL (3), J.J. GUILLAUMIN (3), M. GUESQUIERE (2)
(1) UMR INRA-DGER 188, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, B.P. 83, 69280 Marcy l'Etoile
(2) INRA, Génétique et Amélioration des Plantes Fourragères, 86600, Lusignan
(3) INRA, Amélioration et Santé des Plantes, 234 Av. du Brézet, 63039, Clermont-Ferrand

RESUME—La présence de champignons endophytes vivant en symbiose avec certaines graminées est courante en Europe. Des niveaux d'infection importants peuvent être trouvés dans des lots de semences ou des prairies sauvages et cultivées. L'analyse des principales mycotoxines d'endophytes dans des populations infectées de *L.perenne* et de *F. arundinacea* démontre la présence de niveaux de lolitrem B et d'ergopeptides (ergovaline) a priori suffisants pour provoquer des troubles aigus trouvés dans les conditions d'élevage aux USA ou en Nouvelle-Zélande. Le nombre restreint d'études européennes dont nous disposons montre qu'outre des effets nettement négatifs sur l'appétabilité, seules de légères réductions de croissance sont observées en alimentant des animaux avec des fourrages endophytés. Une diminution franche de la prolactinémie est par contre souvent observée. Plusieurs cas de «Rye grass stager» ont été répertoriés en particulier avec la consommation de variétés à gazon de portegraines de *L.perenne*. Des cas cliniques d'intoxication par l'ergovaline n'ont été observés qu'en France. En dépit de leur ubiquité démontrée, les endophytes des graminées ne semblent pas poser de problèmes majeurs en Europe au plan de la santé animale et des niveaux de production.

Impact of grass endophyte toxins in Europe

S. BONY (1), J.C. EMILE (2), A. DURIX (1), C. RAVEL (3), J.J. GUILLAUMIN (3), M. GUESQUIERE (2)
(1) UMR INRA-DGER 188, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, B.P. 83, 69280 Marcy l'Etoile

SUMMARY- The presence of endophyte fungi is widespread in European grasslands. Both wild and cultivated grass populations harbour significant infection levels. Mycotoxin analysis demonstrated the presence of the main groups of mycotoxin responsible for animal disease in the U.S.A. and N.Z. i.e. lolitrem B and ergopeptides (ergovaline) in *Neotyphodium* infected *Lolium perenne* or *Festuca arundinacea* populations. The toxin levels found are often within or above the range of potentially toxic levels described elsewhere.

The few controlled studies undertaken in Europe, show that no or only a slight reduction in the animal production levels are observed and that prolactinemia is lowered when endophyted forages are fed to lambs, heifers or dairy cows.

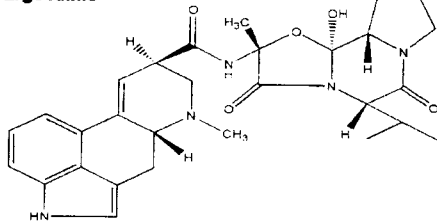
Some acute clinical cases of «ryegrass staggers» have been observed essentially with turf-type *L.perenne* cultivars in many European countries. Cases of ergovaline acute toxicity were only observed in France.

Despite their ubiquity, grass endophytes can not currently be described as a bane in Europe in terms of animal health and production levels.

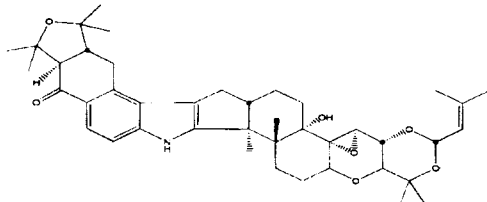
INTRODUCTION

L'Europe constitue le principal réservoir génétique d'associations entre les graminées des genres *Lolium* et *Festuca* avec les champignons endophytes du genre *Neotyphodium*. Plante hôte et champignon vivent en symbiose mutualiste et l'association confère à la plante, dans certaines conditions, une résistance accrue à divers stress d'ordre abiotique d'une part (sécheresse, carence du sol en azote), et biotique d'autre part (attaque par les ravageurs, insectes et nématodes, prédation par les animaux herbivores). Ces derniers effets sont liés à la synthèse dans la plante par le champignon d'une large série de mycotoxines dont les représentants majeurs sont : l'ergovaline (ergopeptide dopaminergique à action vasoconstrictive et hypoprolactinémiant), le lolitrem B (alcaloïde trémorgénique) et la péramine exerçant un effet toxique et répulsif puissant vis-à-vis des insectes.

Ergovaline



Lolitrème



De nombreuses études Nord-Américaines et Néo-Zélandaises décrivent que les animaux consommant des fourrages endophytés peuvent présenter des pathologies aiguës graves d'une part et d'autre part des baisses de niveau d'ingestion et de niveaux de production. (Thompson et Stuedemann, 1993, Fletcher et al 1999).

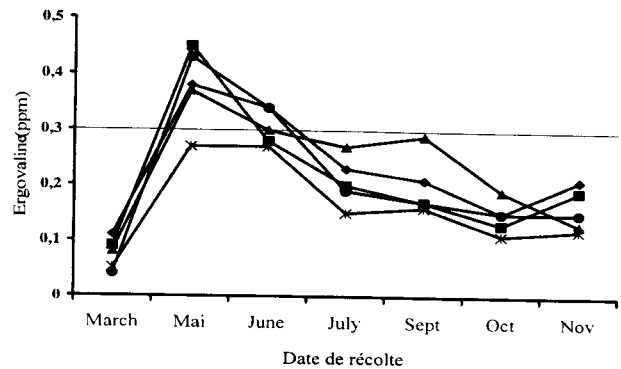
Ce papier résume les principaux travaux réalisés en Europe et en France en particulier au cours des 6 dernières années, afin d'évaluer l'impact agronomique et en santé animale de la consommation de ce type de fourrage dans nos conditions d'élevage.

NIVEAUX D'INFECTION ET DES MYCOTOXINES

A l'échelle européenne, environ 50% des populations naturelles de ray-grass anglais sont porteuses de champignons endophytes à des degrés d'infection variables (Lewis, 2000). En France, ce chiffre atteint même 70% (Lewis et al 1997). Il existe à ce jour, assez peu de données sur l'état endophyté des variétés commercialisées. Certains lots testés atteignent cependant 10 à 15% d'infection. La présence d'endophytes dans les variétés à gazon est beaucoup plus fréquente (FNAMS, 1998). En France, le CTPS travaille à la mise en place d'une règle à appliquer au plus tard en 2004, qui limitera le niveau d'infection des lots de semences pour l'inscription au catalogue officiel des nouvelles variétés fourragères et à gazon. Cette démarche d'appliquer le principe de précaution est avalisée par la plupart des semenciers privés français.

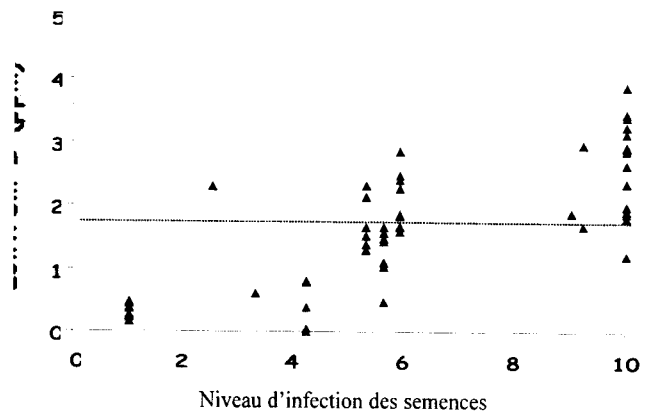
La mise en place de méthodes validées de quantification des toxines d'endophytes en Europe est récente et la France y fait figure de pionne. Les campagnes d'évaluation du niveau d'exposition et les mesures ponctuelles montrent que la teneur en ergovaline dans des foin, des pailles ou des fourrages en vert, peut atteindre des niveaux deux à dix fois supérieurs aux seuils de toxicité décrits aux U.S.A. (environ 0,3 mg/kg MS, Craig et Blythe, 2000). Cependant, il existe des variations saisonnières importantes et, dans les conditions agro-climatiques françaises (sud-ouest du pays), les teneurs maximales sont rencontrées en fin de printemps et/ou en fin d'automne (fig. 1) (Durix et al 1998).

Figure 1
Variations saisonnières de la teneur en ergovaline des repousses de différentes variétés de *F. arundinacea* endophytées. (Ligne horizontale correspondant au seuil de potentiel toxique)



Pour le lolitrem B, (exclusivement retrouvé dans les *Lolium*) des teneurs potentiellement toxiques (> 2mg/kg MS) sont également rapportées (Bony et Delatour, 2000). Le pic de production se situe en fin d'été et les porte-graines de variétés à gazon ou les regains d'automne peuvent constituer une base de ration particulièrement toxique, puisque des taux supérieurs à 2 mg/kg y ont été retrouvés à plusieurs reprises (fig.2).

Figure 2
Influence du niveau d'infection des semences sur la teneur en lolitrem B des porte-graines correspondants.



L'existence des situations réellement «à risque» pour la santé animale reste cependant assez exceptionnelle en Europe, et il faut préciser ici que ces niveaux élevés correspondent rarement aux situations les plus courantes d'utilisation de l'herbe dans les systèmes européens (prairies permanentes mono espèce de variétés fourragères, prairies naturelles...)

INCIDENCES SUR LES PRODUCTIONS ANIMALES

Les études européennes en conditions contrôlées visant à identifier et à quantifier l'effet de la consommation de fourrage endophyté sont rares. En Allemagne, Oldenburg et al (1998) ont mesuré une réduction significative du gain de poids journalier chez deux races d'agneaux élevés au pâturage, consommant une même variété de *L.perenne* Néo-Zélandaise très fortement endophytée (93%). En France, un travail assez exhaustif sur agneau, mouton adulte, génisse et vache laitière consommant selon le cas, deux variétés françaises de fétuque élevée (Clarine) ou de ray-grass anglais (Vigor) a été réalisé à l'INRA de Lusignan.

Les deux fourrages, chacun dans leur version fortement (E+) et pas ou très faiblement endophytée (E-) ont été comparés sur la base des critères de leur valeur alimentaire et des performances animales permises (composition, appétabilité, ingestion, digestibilité, croissance, production laitière...). L'endophyte ne modifie jamais la composition chimique et la valeur alimentaire du fourrage mais son appétabilité testée en cafétéria d'auges sur moutons adultes est généralement réduite (Emile et al 1996).

La consommation pendant trois mois d'une ration à base de foin de fétuque E+ par des génisses de race Holstein n'a pas eu d'effet sur l'ingéré, la température corporelle et le comportement des animaux. Par contre, une réduction apparente de 10% du gain moyen quotidien et une forte réduction de la prolactinémie plasmatique ont été mises en évidence par comparaison à un groupe témoin consommant le même cultivar de fétuque mais indemne d'endophyte. Après 7 semaines d'arrêt de la consommation du fourrage E+, aucune rémanence des effets n'existait.

L'année suivante, des foins E+ et E- issus des mêmes parcelles ont été utilisés dans un essai d'alimentation avec des agneaux mâles Texel. Une légère réduction du poids corporel à l'abattage après 95 jours a encore été notée, mais cette réduction s'expliquait entièrement par un plus faible taux de remplissage du rumen des animaux, le poids de carcasse des agneaux n'étant pas significativement modifié par la consommation du fourrage endophyté, ceci malgré une teneur en ergovaline très forte (0,96 mg/kg MS) (Emile et al 2000). Le même fourrage a produit les effets similaires sur vaches laitières (pas d'effet sur l'ingéré volontaire, baisse de prolactinémie, baisse du poids du contenu du rumen, même poids de carcasse) (Emile et al 1998). Aucun effet sur la production laitière n'a été observé au cours de la période expérimentale (six semaines). Enfin, aucun signe clinique n'a été remarqué chez ces animaux.

Il est donc à conclure, que malgré des conditions expérimentales inhabituellement stressantes (fourrages 100% endophytés, fort pourcentage d'herbe dans la ration, conditions climatiques estivales), aucune perte économiquement quantifiable n'a pu être décrite au cours de ces travaux.

Ces derniers restent cependant trop parcellaires pour valider une absence totale de risque et il est à noter qu'ils n'ont jamais porté sur un fourrage à forte teneur en lolitrem B.

Il serait en particulier intéressant de pouvoir tester l'effet de la consommation de *L.perenne* associé à *N. lolii* (produisant à la fois de l'ergovaline et du lolitrem B) sur les productions animales dans nos conditions d'élevage européennes, ces associations hôte/champignon étant en effet les plus fréquentes sur notre territoire (Bony et al 2001a).

CAS CLINIQUES DE TOXICOSE A ENDOPHYTE

Hormis quelques cas en France et en Espagne, les toxicoses liées à la consommation de fétuque élevée endophytée contenant de l'ergovaline (gangrènes sèches des extrémités, intolérance à la chaleur, hyper ventilation, augmentation du rythme cardiaque...) sont rarement identifiées et diagnostiquées comme telles en Europe (Iceaga 1991, Le Bars et Le Bars 1996).

Des cas de «Rye grass stagger» (RGS) qui sont caractérisés par des tremblements du cou et des épaules, des trémulations musculaires plus diffuses et de l'incoordination motrice pouvant aller jusqu'à la chute au sol ont par contre été répertoriés à plusieurs reprises et dans plusieurs pays européens. (Bony et Delatour 2000).

Ces cas concernent en majorité des animaux au pâturage, en conditions d'été sec et chaud ou en début d'automne. Ces intoxications causées principalement par le lolitrem B, sont également les plus fréquentes sur les prairies semées et âgées de plus de 10 ans. L'avantage (en termes de résistance à la sécheresse et de pérennité) conféré par la présence du champignon à la plante conduit en effet à une augmentation du taux d'infection des prairies avec leur âge.

En France, l'information sur l'existence de cette pathologie et son étiologie circule depuis quelques années seulement auprès des vétérinaires. Cette démarche d'information a conduit à répertorier au cours des trois dernières années plusieurs cas cliniques spectaculaires. L'analyse des 6 cas les plus récents (2000 et 2001) montre que le taux d'infection des prairies concernées était élevé (généralement > 40%) mais la teneur en lolitrem B très variable. Dans deux cas, une même variété fourragère de ray-grass anglais était en cause et la teneur en lolitrem B proche de 2 mg/kg, seuil de toxicité décrit classiquement en Nouvelle Zélande. Dans 4 cas, des porte-graines

ou des regains d'automne de variétés à gazon étaient en cause. Le dosage du lolitrem B s'est situé alors entre 3 et 6mg/kg. Il est intéressant de préciser que dans 3 de ces cas (tous identifiés dans le nord-ouest de la France), le praticien vétérinaire a commencé par lancer une alerte d'encéphalite spongiforme bovine. Les troubles nerveux provoqués par la consommation de *Lolium* endophyté riche en lolitrem B sont en effet non spécifiques et ils sont importants à connaître dans une démarche de diagnostic différentiel...

Les principaux éléments à retenir pour caractériser le RGS sont d'une part, qu'un ray-grass anglais constitue une grande partie de la ration (en vert, en sec ou ensilé) et que les troubles nerveux atteignent généralement la majorité des individus du troupeau en 48 à 72h après l'apparition des symptômes chez le ou les premiers animaux. Les signes cliniques disparaissent en quelques jours à l'arrêt de la consommation du fourrage suspecté.

RISQUE POUR LE CONSOMMATEUR HUMAIN

Les informations existantes sur le devenir des toxines d'endophyte dans l'organisme animal et sur leur passage éventuel dans des produits animaux consommables par l'homme sont extrêmement rares.

Dans le cas de l'ergovaline, nos propres travaux montrent que la demi-vie plasmatique de la molécule est très courte chez plusieurs espèces (Jaussaud et al 1998, Bony et al 2001b) et que le passage de la molécule mère dans le lait chez la chèvre est très limité (Durix et al 1999). Cependant, il semble que l'ergovaline soit sujette à une biotransformation ruminale dans un premier temps puis subirait (selon le modèle d'autres ergopeptides d'intérêt médicamenteux plus étudiés) une oxydation au niveau hépatique via des oxydases à cytochrome P450 et ou des conjugaisons. Les produits de ces biotransformations, encore mal identifiés (mais probablement proches d'amides lysergiques) pourraient présenter un risque pour le consommateur.

Le devenir du lolitrem B dans l'organisme ainsi que son métabolisme et ses voies d'élimination ne sont pas connus. Nous travaillons actuellement à l'isolement de quantités suffisantes de la molécule pure en vue d'études à caractère toxicocinétique et de distribution (excrétion, passage dans le lait).

CONCLUSION

Il est clairement établi que la présence de champignons endophytes du genre *Neotyphodium* est courante au sein des populations de *Lolium* et de *Festuca* en Europe. La synthèse des métabolites secondaires toxiques est également commune et aucun écotype sauvage sans ergovaline ni lolitrem B n'a jusqu'à présent été trouvé en France au sein des populations naturelles.

Cependant, malgré des niveaux de synthèse de toxines souvent aussi élevés que ceux décrits aux U.S.A. ou en Nouvelle-Zélande, (pays où leur incidence économique néfaste est démontrée et chiffrée), il apparaît au regard des résultats d'expérimentation et du terrain en Europe que la présence des endophytes ne soit pas à ce jour la cause de pertes économiques identifiables et quantifiables.

Les raisons de l'apparente et relative «innocuité» des endophytes sur notre continent sont à rechercher dans des facteurs agro-climatiques d'une part, et de systèmes d'élevage et d'alimentation d'autre part :

La durée de vie des prairies semées en Europe est assez courte, limitant l'incidence forte de l'âge sur leur niveau d'infection. La fétuque élevée est peu utilisée en prairie mono espèce et les prairies en mélange et naturelles sont majoritaires. Elles conduisent à une dilution de la consommation de toxines d'endophytes exclusivement associées à certaines espèces de graminées.

Le ray-grass anglais est par contre très présent notamment dans toute la moitié nord de l'Europe tempérée. Cependant, le «tout pâturage» y est limité et la complémentation énergétique et azotée est presque systématique. Nous différons sur ce plan des systèmes à l'herbe très extensifs utilisés en Nouvelle-Zélande par exemple.

D'autres facteurs pourraient être évoqués comme d'éventuelles particularités européennes au plan de l'équilibre entre les différentes toxines limitant leur toxicité, ou encore l'existence plus hypothétique de voies de biotransformation (notamment ruminales) particulières.

Il reste que compte tenu de leur ubiquité sur notre territoire, les champignons endophytes et leurs toxines devraient faire l'objet d'une veille scientifique. Cette dernière nous semble particulièrement utile, dans le contexte actuel d'accroissement de l'utilisation de l'herbe dans les systèmes d'élevage et d'alimentation.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les membres de l'ACVF (association des créateurs de variétés fourragères) et la FNAMS (fédération nationale des agriculteurs multiplicateurs de semences) pour leur collaboration très fructueuse au plan des essais agronomiques et de l'étude des variations de la production de toxines d'endophytes.

Bony, S., Delatour, P., 2000. In PAUL V.H. and DAPPRISH P. (Editors) Proceedings of the Grassland Conference 2000, 4th International *Neotyphodium*/grass Interactions Symposium. Paderborn Universität .Germany. 207-219.

Bony, S., Pichon, N., Ravel, C., Balfourier, F., Guillaumin, J.J. 2001 a. New Phytol. 152, 125-137.

Bony, S., Durix, A., Leblond, A., Jaussaud, P. 2001b. Vet. Res. 32. 509-513

Craig, A.M., Blythe, L.L. 2000. Rev. Med. Vet. 151, 686.

Durix, A., Ravel, C., Bony, S., Balfourier, F., Guillaumin, J.J., Ghesquiere, M., Chosson, J.F., Charmet, G. 1998 Rev. Med. Vet., 149, 528.

Durix, A., Jaussaud, P., Garcia, P., Bonnaire, Y., Bony, S. 1999. J. Chrom. B. 729, 255-263.

Emile, J.C., Ghesquiere, M., Traineau, R. 1996. Ann. Zootech. 45, 401-410.

Emile, J.C., Bony, S., Ghesquiere, M. 1998. Rev. Med. Vet. 149, 631.

Emile, J.C., Bony, S., Ghesquiere, M. 2000. J. Anim. Sci. 78, 358-364.

Fletcher, L.R., Sutherland, B.L., Fletcher, C. 1999. In WOODFIELD D.R. & MATTHEW C (Editors), Ryegrass endophyte: an essential New Zealand Symbiosis. Grassland Research and Practice series. 7, 10-17.

F.N.A.M.S. 1998. Bulletin technique 1997-1998, 19-21

Iceaga, F. 1992. Les toxicoses du bétail dues aux *Acremonium*, champignons endophytes de la fétuque et du ray-grass anglais. Thèse Doct. Vet. Toulouse

Jaussaud, P., Durix, A., Videmann, B., Vigié, A., Bony, S. 1998. J. Chrom. A. 815, 147-153

Le Bars J., Le Bars, P. 1996. Vet. Res. 27, 383-394.

Lewis, G.C., Ravel, C., Naffaa, W., Astier, C. Charmet, G. 1997. Ann. Appl. Biol. 130, 227-238.

Lewis, G.C. 2000. In PAUL V.H. and DAPPRISH P. (Editors) Proceedings of the Grassland Conference 2000, 4th International *Neotyphodium*/grass Interactions Symposium. Paderborn Universität .Germany. 201-206

Oldenburg, E., Weissbach, F., Valenta, H., Höltershinken, M., Barkow, B., Loose, K. 1998. Rev. Med. Vet. 149, 638.

Thompson, F.N., Stuedemann, J.A. 1993. Agric. Ecosyst Environm. 44, 263-281.