

CONDITIONS DE STOCKAGE DE LA PAILLE CONDUISANT AU DEVELOPPEMENT DU *STACHYBOTRYS atra* EN FRANCE. TOXINOGENESE DES SOUCHES.

LE BARS P., LE BARS J.

Institut National de la Recherche Agronomique
Laboratoire de Pharmacologie -Toxicologie
B.P. 3 - 31931 TOULOUSE Cedex

ABSTRACT:

STORAGE CONDITIONS OF STRAW LEADING TO *STACHYBOTRYS atra* DEVELOPMENT IN FRANCE. TOXINOGENESIS OF STRAINS

Consecutively to acute and chronic stachybotryotoxicosis in horses and allergic disorders in stablemen, ecological and toxicological studies were run on the toxigenic mold *Stachybotrys atra*.

Among foods, feeds and feedstuffs, straw is the only substrate showing natural heavy contamination by this cellulolytic species. The main technological and ecological conditions conducive to such a condition are :

- remoistening of the lower layer of parallelepipedic bales from watery ground (i.e. Sologne area), or of the upper layers following a leak in the shed roofing (i.e. consecutively to a storm);

- round balling straw in the morning with dew, conducing to an internal general contamination;

- covering round ball stack in the field with a plastic sheet, leading to a superficial growth, mainly on the stack top, as a result of condensation;

- insufficiently compressed round balls, allowing rain penetration, and consecutive fungal contamination of a sector;

In the three last conditions, significant development of *S. atra* and problems in animals occur after one to three month of storage.

Isolated strains (20) are compared for morphology, growth rate in function of temperature and toxinogenesis. There is a clear distinction of two groups : (i) 85 % weakly or no toxigenic strains, (ii) 15 % being about one thousand times more toxigenic. No link is observed between morphological characters and toxinogenesis. However toxic strains belong, firstly, to the fastest growth rate group, and, secondly, to the thermopreferent group.

INTRODUCTION:

Le *Stachybotrys atra* est une moisissure saprophyte affectionnant les substrats riches en cellulose, en particulier les pailles récoltées humides ou réhumidifiées. Les souches toxigènes élaborent des trichothécènes macrocycliques (HARRACH et al, 1983) dont l'ingestion provoque des troubles graves chez les animaux (LE BARS, 1977) et chez l'Homme manipulant de telles denrées (LE BARS et LE BARS, 1985; RECCO et al, 1986). La stachybotryotoxicose est

relativement fréquente sous sa forme aiguë en URSS (VERTINSKII, 1940; FORGACS, 1972) et dans les pays de l'Europe de l'Est (DANKO, 1976; HARRACH, 1983). Elle survient épisodiquement en France, rarement sous sa forme aiguë (LE BARS et al, 1977), plus fréquemment sous sa forme chronique (SERVANTIE et al, 1985; BORDAS et al, 1987).

Afin d'apporter des éléments complémentaires pour la prévision et la prévention, l'objectif de ce rapport est de faire le point sur les différentes conditions pratiques ayant conduit à des contaminations importantes, d'examiner si certains critères morphologiques ou culturels sont liés à la toxinogénèse, et d'estimer la répartition du potentiel toxinogène dans les souches isolées dans notre pays.

MATERIEL ET METHODES:

Les souches de *S.atra* furent isolées de pailles suspectes entre 1974 et 1984. Dans des cas de contamination importante, une enquête a été réalisée pour déterminer l'extension de cette moisissure dans le lot et les causes de son développement. L'identification de l'espèce a été effectuée selon les critères de ELLIS (1971) ; les variations morphologiques macroscopiques (aspect des thalles) et microscopiques (taille, forme des conidies, ...) ont été relevées.

Pour l'étude de l'effet de la température sur la croissance, chaque souche futensemencée au centre de 3 boîtes de Pétri (90 mm) contenant le milieu au malt (2%) gélosé et incubées à 5,10,15,20,25,30,35,40,45 et 50°C, dans des enceintes au voisinage de la saturation en eau pour éviter la déshydratation des milieux de culture. La croissance fut appréciée périodiquement par le diamètre moyen du thalle.

Pour la toxinogénèse, les milieux liquides étant très peu favorables, les souches furent mises en culture, à 22°C, pendant 1,5 mois, sur des grains d'orge humidifiés (30 g, teneur en eau 50%) et stérilisés, en erlenmeyers de 250 ml. Chaque semaine, une série de cultures fut soumise à l'extraction. Celle-ci est effectuée, à deux reprises, par macération pendant 24 heures avec 90 ml d'acétate d'éthyle (HARRACH et al 1981). Le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif et repris par 50 ml du mélange acétonitrile-eau (5% KCl) (90:10); après délipidation par partition contre l'iso-octane (30 ml x 2), il est évaporé, puis repris par 10 ml d'acétonitrile, 30 ml d'eau et 10 ml de solution d'acétate de plomb (200 g + 3 ml acide acétique / litre) pour la défécation (10 minutes) suivie de filtration; les toxines sont extraites par le chloroforme (20 ml x 2), qui est déshydraté (Na₂SO₄), puis évaporé. L'extrait final est repris quantitativement et dilué dans 200 µl d'acétate d'éthyle. Ce procédé de purification n'a pas entraîné de pertes détectables par le test biologique de quantification utilisé.

La quantification des trichothécènes fut basée sur l'action irritante et nécrosante sur la peau de l'animal. L'unité dermonécrosante (U.D.) fut définie comme la quantité minimale provoquant 50 % de réponse positive au 3ème jour et demeurant visible au 6ème jour. Dans un premier temps les extraits furent dilués dans l'acétate d'éthyle en progression géométrique de raison 2 jusqu'à 1/2048. Dans un second temps, à partir de la concentration provoquant une nécrose pour toutes les applications, des dilutions en progression arithmétique furent réalisées. Chaque dilution fut déposée, à l'aide de micropipettes à usage unique (2 µl) sur le dos rasé et nettoyé à l'alcool de 5 rats femelles WISTAR (120-150 g), chaque animal recevant 8 extraits différents. Le calcul de la dilution efficace à 50 % (= U.D.) fut effectué selon la méthode de KARBEN (LELLOUCH et LAZAR, 1968) ; la concentration est exprimée en nombre d'U.D. par gramme de matière sèche initiale d'orge.

Diamètre du thalle
(mm)

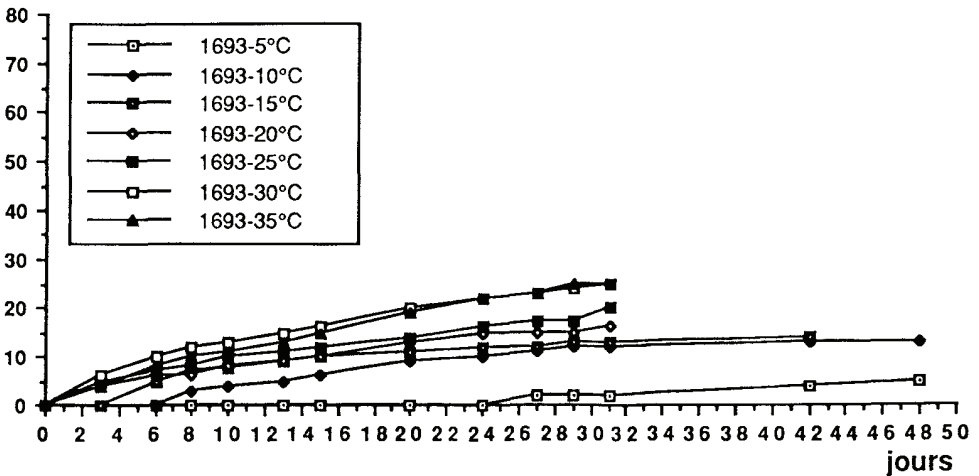
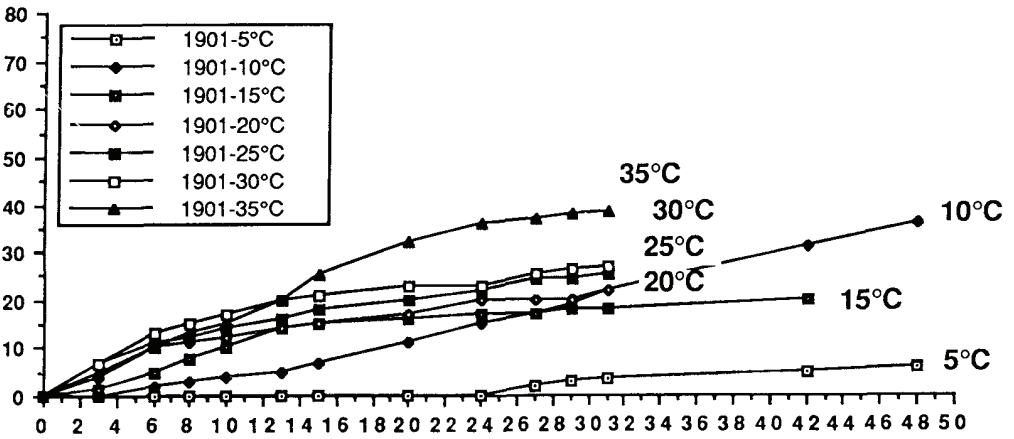
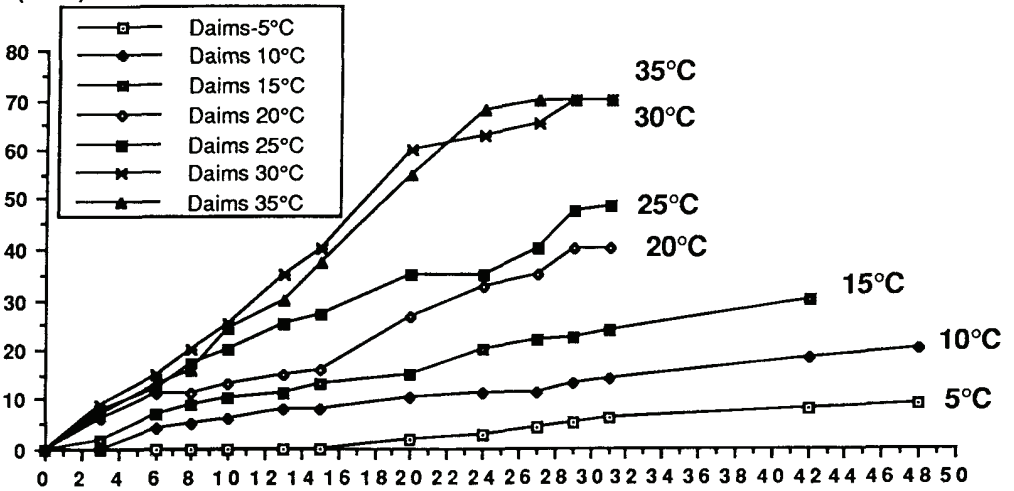


Figure 1 - Courbes de croissance radiale en fonction de la température des trois types de souches de *S. atra* (daims - 1901 - 1693).

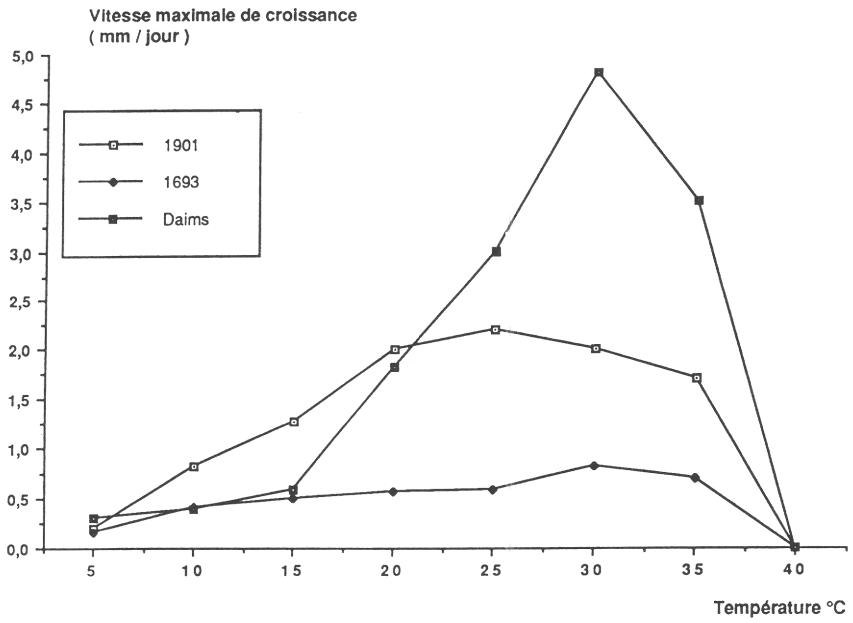


Figure 2 - Vitesse maximale de croissance radiale en fonction de la température pour les trois types de souches.

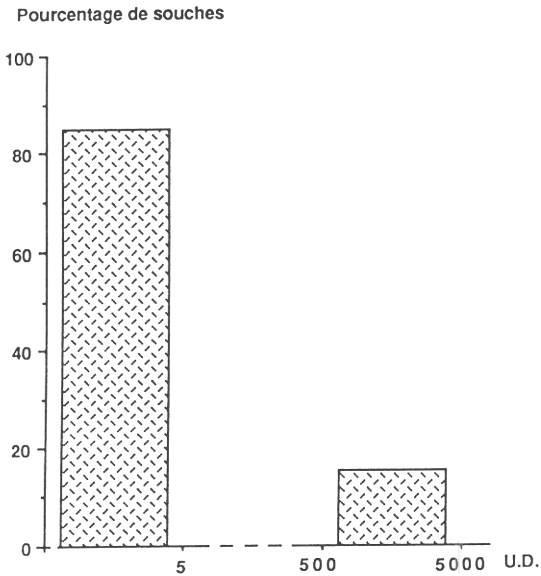


Figure 3 - Distribution du potentiel toxigène dans les trois souches de *S. atra*.

RESULTATS:

Les observations effectuées lors des enquêtes sur les contaminations importantes de pailles par le *Stachybotrys atra* peuvent être regroupées comme suit :

1 - balle parallélépipédiques se trouvant à la base du tas dans des zones où le sol est humide ou sujet à des infiltrations d'eau (exemple en Sologne);

2 - trainée verticale de développement du *S.atra* consécutive à des fuites dans le toit du hangar;

3 - développement en surface (sur une profondeur de 3 à 15 cm) de grosses balles rondes empilées dans le champ et recouvertes d'une bâche en matière plastique, résultat d'une condensation d'eau, principalement vers le sommet du tas;

4 - contamination interne, relativement homogène, de grosses balles rondes; elle provenait du fait que ces pailles avaient été récoltées le matin alors qu'elles étaient imprégnées de rosée;

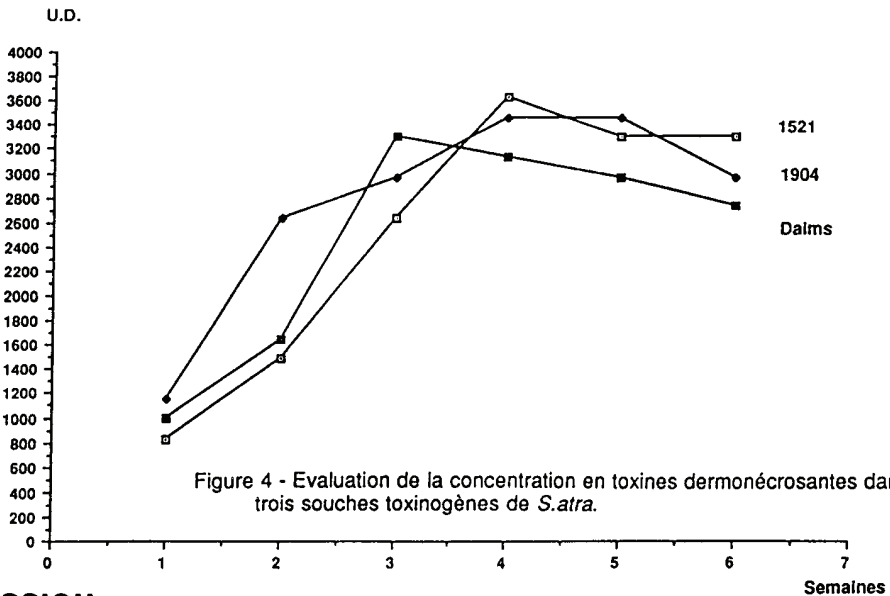
5 - développement localisé dans un secteur, parfois jusqu'au centre, de grosses balles rondes; la pluie des orages importants du mois d'août avait pénétré dans les balles à cause d'une compression insuffisante et d'une tension trop faible des ficelles.

Toutes les souches de *Stachybotrys* examinées correspondent bien à l'espèce *S.atra* Corda . Toutefois la souche en cause dans la mortalité des daims (LE BARS et al, 1975) présente des mensurations plus petites et une granulation plus discrète que l'espèce type; de ce fait, elle peut être désignée comme *S.atra* var. *microspora* MATHUR et SANKHLA .

En ce qui concerne l'influence de la température sur la croissance (fig.1), les éléments essentiels communs sont les suivants. A peine discernable à 5°C après un temps de latence d'environ trois semaines, la croissance est maximale vers 30-35°C; elle est inhibée dès que la température atteint 40°C. Enfin, après une incubation à 50°C pendant 5 semaines, aucune culture ne se développe ultérieurement à 20°C pendant 3 semaines. Des différences apparaissent entre les souches quant à la croissance (fig.1) et surtout quant à la vitesse maximale de croissance (fig.2).Trois groupes de souches peuvent être distingués: les unes à croissance lente (n° 1693), d'autres à croissance modérée dans une large zone de température optimale (n° 1901) et enfin des souches à croissance importante et rapide présentant une température optimale nettement définie aux environs de 30°C.

Les extraits concentrés de 17 souches ne provoquèrent que des réactions à la limite de la détection: 3 à 5 U.D.₅₀ / g d'orge (M.S.), après 3 à 4 semaines d'incubation (fig.3). Trois souches seulement ont présenté une intense activité dermo-necrosante: l'U.D. 50 fut obtenue par des concentrations 250 à 1000 fois plus faibles (825 à 3630 U.D. / g d'orge).

L'accumulation maximale de ces toxines se situe entre la 3 ème et 5 ème semaine d'incubation (fig 4).



DISCUSSION :

Les contaminations importantes des pailles par le *S. atra* ont pour cause majeure une négligence et un manque d'observation de la part de l'agriculteur ou de l'éleveur.

Contrairement à nos observations sur une autre espèce cellulolytique, le *Pithomyces chartarum* (LE BARS et al, 1990), aucune relation nette n'est apparue entre les variations morphologiques et le potentiel toxigène, en accord avec KORPINEN et UOTI (1974).

Certains auteurs, surtout russes, ont établi des distinctions entre *S. atra* Corda et *S. alternans* Bon., et même une variété de cette dernière espèce (var. *Jateli*) pour désigner les souches toxiques. BISBY (FORGACS, 1972) et ELLIS (1971) ne reconnaissent pas ces distinctions et ne retiennent qu'une seule espèce sous la dénomination de *S. atra*.

Les températures cardinales de la croissance résultant de cette étude sont voisines de celles définies par PANASENKO (1967) : 2-3°C, 25-27°C, 37-40°C. Toutefois, sur la base des souches examinées, trois groupes peuvent être distingués quant à l'importance de l'extension du thalle, la vitesse maximale de croissance et la température optimale.

Les spores sont thermolabiles étant donné qu'elles ne peuvent plus se développer après un séjour prolongé à 50°C. Ceci constitue une des explications du fait que, contrairement à certains auteurs (HINTIKKA, 1977), nous n'ayons jamais pu isoler le *S. atra* à partir de foin; en effet, dans nos régions, les foin sont pressés en balle peu de temps après la coupe et présentent un échauffement prolongé ("coup de feu"), alors que, en particulier en Europe centrale, ces foin sont mis à sécher au préalable sur des chevalets.

La détection et la quantification des trichothécènes macrocycliques du *S. atra* (JARVIS et al, 1986) par des méthodes physico-chimiques demeurant laborieuses (STACK et EPPLEY, 1980; HARRACH et al, 1983; HARRACH et al, 1988), une estimation semi-quantitative par le test de l'irritation cutanée permettait de répondre à l'objectif fixé; il existe en effet, d'une part, une relation dose-réponse entre la quantité de trichothécènes et l'intensité de la réaction sur la peau de l'animal (CHUNG et al, 1974; HAYES et SCHIEFER, 1979; FAIRHURST et al, 1987) et, d'autre part, une correspondance globale entre l'action dermonécrosante et la toxicité par voie orale (LE BARS, 1976).

La distribution du potentiel toxigène entre les souches de *S. atra* ne se présente pas sous la forme d'une série continue, contrairement à de nombreux Micromycètes (LE BARS, 1987); comme pour le *Pithomyces chartarum* (LE BARS et al, 1990), deux groupes se distinguent nettement, certaines souches étant mille fois plus toxigènes que les autres. C'est probablement pour cette raison que les auteurs russes (FORGACS, 1972) avaient créé une variété (var. *Jateli*) pour ce dernier type de souches.

Ces trois souches toxiques constituent exclusivement le groupe présentant la vitesse de croissance maximale et la plus grande thermopréférence; il ne convient pas toutefois de généraliser cette relation compte tenu du faible nombre de souches étudiées.

La fréquence de souches toxigènes s'avère ici relativement faible (15 %). Dans d'autres pays, des fréquences bien supérieures ont été rapportées: 21 / 21 (YUSKIV, 1969), 49 / 73 (KORPINEN et UOTI, 1974), 14 / 17 (JARVIS et al, 1986). Ceci expliquerait l'apparente rareté des intoxications aiguës dans notre pays et la plus grande fréquence de troubles chroniques, peu pathognomoniques (SERVANTIE et al, 1985; RECCO et al, 1986).

CONCLUSION :

Le *Stachybotrys atra*, espèce fongique ubiquitaire, hygrophile et cellulolytique, affectionne particulièrement les pailles. Toutes les conditions entraînant une activité en eau voisine de la saturation peuvent permettre son développement. Il apparait, parmi les souches françaises, deux groupes distincts quant à leur aptitude toxigène. Malgré la relative faible fréquence de souches dangereuses, il convient non seulement de respecter les conditions générales d'une bonne conservation de cette denrée, souvent négligée, mais aussi, tout particulièrement lors du conditionnement en grosses balles, de veiller à récolter de la paille bien sèche en suivant les recommandations des Instituts Techniques. Enfin, l'éleveur doit écarter et brûler les zones suspectes, présentant un aspect de "suie fine noire", pour la protection de la santé animale et humaine.

REFERENCES:

- BORDAS C., BLOCH J.C., LE BARS J., ROUDIER J. and TISSERAND R. (1987). Prévention d'un cas clinique évoquant une mycotoxicose à *Stachybotrys* sur un cheptel bovins charolais de la Nièvre. Bull. Soc. Fr. Mycol. Méd., **71**, 142-155.
- CHUNG C.W., TRUCKSESS M.W. and GILES A.L. (1974). Rabbit skin test for estimation of T2 toxin and other skin irritating toxins in contaminated corn. J. Ass. Off. analyt. Chem., **57**, 1121-1127.
- DANKO G. (1976). (On the stachybotryotoxicosis of sheep). Magy. Allatorv. Lapja, **31**, 226-232.
- ELLIS M.B. (1971). Dematiaceous Hyphomycetes. Comm. Mycol. Inst., Kew, Surrey, U.K., 540-544.
- FAIRHURST S., MAXWELL S.A., SCAWIN J.W. and SWANSTON D.W. (1987). Skin effects of trichothecenes and their amelioration by decontamination. Toxicology, **46**, 307-319.
- FORGACS J. (1972). Stachybotryotoxicosis, In KADIS S., CIEGLER A. and AJL S.J. "Microbial toxins" VIII, Acad. Press, N.Y., 95-108.
- HARRACH B., MIROCHA C.J., PATHRE S.V. and PALYUSIK M. (1981). Macrocyclic trichothecene toxins produced by a strain of *Stachybotrys atra* from Hungary. Appl. Environ. Microbiol., **41**, 1428-1432.

- HARRACH B., BATA A., BAJMOCY E. and BENKO M. (1983). Isolation of satratoxins from the bedding straw of a sheep flock with fatal stachybotryotoxicosis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1419-1422.
- HARRACH B., (1988). Method for small routine laboratories for the detection of satratoxins in straw samples. *Mycotoxin Res.*, **4**, 20-24.
- HAYES M.A. and SCHIEFER H.B. (1979). Quantitative and morphological aspects of cutaneous irritation by trichothecene mycotoxins. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **17**, 611-621.
- HINTIKKA E.L. (1977). The genus *Stachybotrys* - In WYLLIE T.D. and MOREHOUSE L.G. *Mycotoxic Fungi - Mycotoxins - Mycotoxicosis*, **1**, 91-98. M. DEKKER Inc, N.Y.
- JARVIS B.B., LEE Y.W., COMEZOGU S.N. and YATAWARA C.S. (1986). Trichothecens produced by *Stachybotrys atra* from eastern Europe. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 915-918.
- KORPINEN E.L. and UOTI J. (1974). Studies on *Stachybotrys alternans*. II. Occurrence, morphology and toxinogenicity. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, sect. B, **82**, 1-6.
- LE BARS J. (1976). La stachybotryotoxicose: un test pratique de mise en évidence des toxines. Signification et limites. *Bull. Soc. Vet. Prat. de France*, **60**, 489-497.
- LE BARS J. (1977). La stachybotryotoxicose: une mycotoxicose fatale due à *Stachybotrys atra* Cda. *Rev. Méd. Vét.*, **128**, 51-69.
- LE BARS J. (1987). Toxinogenesis as a function of the ecological conditions of the grains / microorganism system. In MULTON J.L., *Preservation and storage of grains, seeds and their by-products*, LAVOISIER Pub. Inc., N.Y., pp 347-366.
- LE BARS J., GERARD J.P. and MICHEL C. (1977). Mise en évidence de la stachybotryotoxicose en France: un cas d'intoxication aiguë chez des daims. *Ann. Nutr. Alim.*, **31**, 509-517.
- LE BARS J. and LE BARS P. (1985). Etude du nuage de spores de *Stachybotrys atra* contaminant des pailles: risque d'inhalation. *Bull. Soc. Fr. Mycol. Méd.*, **14**, 321-324.
- LE BARS J., OSWALD E., LE BARS P., BONNEFOI M., BEZILLE P. and BRAUN J.P. (1990). Ecotoxinogenesis of *Pithomyces chartarum*. *Food Add. contam.*, **7** (in press).
- LELLOUCH J. and LAZAR P. (1968). Détermination rapide d'une D.E.50: Méthode de KARBER. *Cours de statistique appliquée à la biologie*, **D-9**, C.E.S.A.M., Paris.
- PANASENKO V.T. (1967). Ecology of microfungi. *Bot. Rev.*, **33**, 189-215.
- RECCO P., SERVANTIE J., DE GRAEVE P., DE GRAEVE J., LE BARS J. and ROUCH Y. (1986). A propos d'une stachybotryotoxicose d'allure endémique dans un club hippique de la région toulousaine. *Bull. Soc. Fr. Mycol. Méd.*, **15**, 233-236
- SERVANTIE J., LE BARS J. and BONNEFOI M. (1985). Stachybotryotoxicose équine: première description en France. *Rev. Méd. Vét.*, **136**, 687-692.
- STACK M.E. and EPPLEY R.M. (1980). High pressure liquid chromatographic determination of satratoxin G and H in cereal grains. *J. Assoc. Anal. Chem.*, **63**, 1278-1281.
- VERTINSKII K.I. (1940). (Stachybotryotoxicosis in horses). *Veterinariya*, **17**, 5, 61-68
- YUSKIV R.V. (1969). (Toxicity of different strains of *Stachybotrys alternans* and *S. lobulata*). *Mikrobiol. Zh (Kiev)*, **31**, 27-31.

LES CONDITIONS DE STOCKAGE DE LA PAILLE CONDUISANT
AU DEVELOPPEMENT DE *STACHYBOTRYS ATRA* EN FRANCE

P. LE BARS, J. LE BARS

Institut National de la Recherche Agronomique
Laboratoire de Pharmacologie-Toxicité
180 chemin de Tournefeuille, 31300 Toulouse

RESUME

Des études toxicologiques et écologiques ont été entreprises sur la moisissure *Stachybotrys atra*, à la suite de stachybotryotoxicoses chroniques et aiguës constatées chez le cheval et de troubles allergiques chez les garçons d'étables. Parmi les différents aliments, fourrage ou pâtée, la paille est le seul substrat qui montre une forte contamination naturelle par ces espèces cellulolytiques. Les principales conditions écologiques et technologiques qui conduisent à une telle contamination sont :

- La réhumidification des couches inférieures des balles sur sol humide (par ex.: en Sologne), ou des couches supérieures à la suite de fuites d'une toiture (par ex. : après un orage) ;

- Les balles circulaires couvertes de rosée du matin, qui conduisent à une contamination intérieure généralisée ;

- Le recouvrement de meules circulaires dans les champs par des feuilles de plastique conduisant à une humidité de surface due à la condensation ;

- Les balles circulaires insuffisamment comprimées perméables à la pluie et permettant l'installation d'une contamination fongique.

Dans les trois dernières conditions, le développement significatif de *S. atra* et certains problèmes chez les animaux surviennent après un temps de un à trois mois de stockage.

On a comparé les souches isolées (n = 20) suivant leur taux de croissance morphologique en fonction de la température et de leur toxicogénèse. Deux groupes se distinguent clairement : (i) 85 %, souches faibles ou non toxigènes, (ii) 15 %, souches à peu près mille fois plus toxigènes. Cependant, les souches toxiques appartiennent, tout d'abord, au groupe possédant le taux de croissance le plus rapide et, ensuite, au groupe thermotolérant.