

Effets du ray-grass endophyté sur le stress oxydatif et les enzymes de biotransformation chez les ovins

Effects of endophyte-infected ryegrass on oxidative stress and biotransformation enzymes in sheep

ZBIB N. (1), REPUSSARD C. (1), TARDIEU D. (1), GUERRE P. (1)

(1) École Nationale Vétérinaire, Laboratoire Mycotoxicologie, 23 chemin des Capelles, BP87614, 31076 Toulouse Cedex 03

INTRODUCTION

Le développement de *Neotyphodium coenophialum* dans la fétuque est associé à la production d'ergovaline (EGV), responsable de la « fescue foot disease » (Tor-Agbidye et al., 2001). La présence de *Neotyphodium lolii* dans le ray-grass anglais (RGA) est associée à la production de lolitrem B (LB), responsable du « ryegrass stagger » (Gallagher et Hawkes, 1985), mais aussi d'EGV (Rottinghaus et al., 1991). En dehors des manifestations cliniques et biochimiques, peu de données sont disponibles sur les effets de ces toxines chez les ovins. Chez les rongeurs, la consommation de graines de fétuques endophytées s'accompagne d'une altération de différents paramètres de stress oxydatifs (Settivari et al., 2008, 2009). Certaines souches de souris seraient plus résistantes à la toxicité du fait d'une surexpression de certaines enzymes de biotransformation de phase 2 (Hohenboken et al., 1997 ; Wagner et al., 2000). L'objectif de cette étude est de présenter les conséquences de la consommation d'un fourrage de RGA endophyté sur des marqueurs du stress oxydatif et les enzymes de biotransformation chez les ovins.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. PRODUCTION DE FOURRAGES ET DOSAGE DES ALCALOÏDES

Deux parcelles Ray Grass anglais de variété Samson non endophytée (SE-) et une endophytée (SE+) ont été semées à l'automne 2010 sur le domaine du lycée agricole de Saint-Affrique "La Cazotte" (Aveyron, France). L'herbe a poussé en continu jusqu'au 21/11. Le foin a été récolté au pic de concentration, juste avant la dissémination des graines. Les teneurs en LB et EGV ont été déterminées par HPLC (Repussard et al., 2011).

1.2 ANIMAUX ET PRELEVEMENTS

24 brebis laitières multipares de race Lacaune (78 ± 10 Kg) ont été réparties en deux lots homogènes et alimentées ad libitum avec du fourrage sec SE- ou SE+ pendant 28 jours. Les paramètres de production ont été enregistrés. Des prélèvements sanguins hebdomadaires ont été effectués à la jugulaire. Des autopsies avec collectes tissulaires ont été réalisées à J7 (n=8) et à J28 (n=16). Des fractions cytosoliques et microsomaux hépatiques et rénales ont été préparées et stockées à -80°C en vue de la mesure des marqueurs du stress oxydatif et les enzymes de biotransformation de phase 1 et 2.

1.3 ANALYSES

Les marqueurs de stress oxydatif ont été mesurés dans le plasma, le foie et les reins. Le dosage du malondialdéhyde (MDA) a été réalisé par spectrophotométrie à 535 nm ou par fluorimétrie (excitation 515 nm et émission 548 nm) (Kohn et Liverzedge 1944; Ghosal et Recknagel 1965). La superoxyde dismutase (SOD) a été mesurée d'après la méthode du kit Fortress diagnostics (United Kingdom) à 540 nm. La catalase (CAT), le glutathion total (GSH) et oxydé (GS-SG), la glutathion réductase (GR) et la glutathion peroxydase (GPx) ont été mesurées d'après la méthode du kit Cayman (Cayman Chemical Company) à 405 nm pour la CAT et le GSH et à 340 nm pour la GPx et GR. La lecture de ces marqueurs a été précédée avec un lecteur de plaque 96 puits de marque (Sunrise™, TECAN).

Les activités enzymatiques de biotransformation de phase 1 (enzymes microsomaux) de N-déméthylation ont été déterminées (dosage spectrophotométrique à 412 nm du formaldéhyde libéré) pour les substrats suivants : benzphétamine, aminopyrine, érythromycine, éthylmorphine et diméthylinitrosamine. Les activités de dé-alkylation ont été déterminées pour l'éthoxyrésorufine, la méthoxyrésorufine et la pentoxyrésorufine par fluorimétrie (excitation 535 nm et émission 582 nm).

Les activités enzymatiques de biotransformation de phase 2 des glutathion transférases (GST) (enzymes cytosoliques) ont été mesurées avec le dichloro nitrobenzène (DCNB) et le dinitro chlorobenzène (CDNB) comme substrat (Habig et al., 1974). L'activité glucuronyl transférase (UDPGT) a été déterminée pour le para-nitrophénol (PNP) (Frei et al., 1970).

Les résultats ont été analysés à l'aide du test de Wilcoxon (logiciel R 2.11.1, Toulouse, France). Un dosage des protéines basé sur la

méthode de Bradford a été réalisé pour l'expression des activités enzymatiques par mg de protéines.

2. RESULTATS

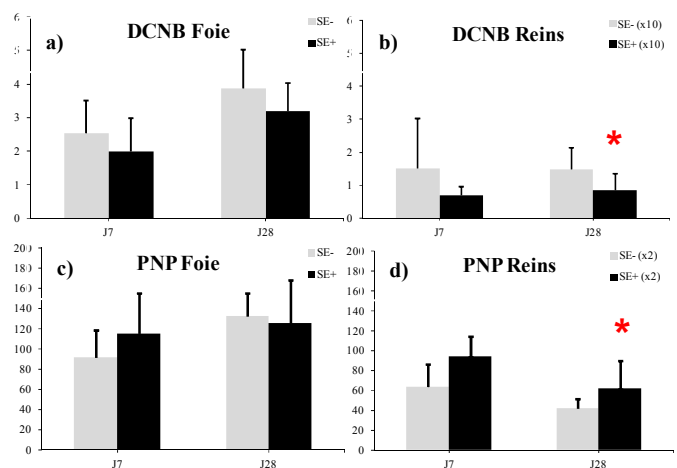
➔ **Stress oxydatif** : Aucune différence significative n'a été observée entre lots quel que soit le type de prélèvement et de paramètre analysé.

➔ **Enzymes de biotransformation** :

- Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre lots en ce qui concerne les enzymes de biotransformation de phase 1 dans le foie et les reins à J7 et J28.

- Une différence significative a été enregistrée sur les enzymes de biotransformation de phase 2 dans les reins à J28 (Fig. b et d) mais pas dans le foie (Fig. a et c).

Figure a, b, c et d : Comparaison des activités des enzymes de biotransformation de phase 2; Fig. a et b : La GST exprimée en mmol de DCNB conjugué/min/mg de prot., Fig. c et d : L'UDPGT exprimée en µmol de PNP conjugué/min/mg de prot. sur brebis laitières consommant du foin de ray-grass non endophyté (SE-) ou endophyté (SE+) à J7 (n=8) et J28 (n=16). Moyenne ± SD.



DISCUSSION

Aucun signe clinique n'a été observé dans cette étude en accord avec les données de la littérature (la dose de LB dans le RGA réputée toxique sur ovins est de 1800 µg/kg MS, Tor-Agbidye et al., 2001). Bien qu'une augmentation du GS-SG et des activités GPx a été rapportée dans les globules rouges en l'absence de signe clinique chez les génisses pâturant de la fétuque endophytée (Burke et al., 2007 ; Lakritz et al., 2002), un stress oxydatif n'a pas pu être détecté dans cette étude chez les ovins. Contrairement à une étude sur foies de rats exposés à des graines de fétuques endophytées (Settivari et al., 2008), aucune différence d'activité des enzymes de biotransformation de phase 1 n'a été enregistrée dans notre expérimentation. Pour les enzymes de biotransformation de phase 2, on observe une augmentation significative d'UDPGT rénale à J28 (Fig. d). Une diminution de cette activité a en revanche été rapportée sur foies de souris exposées à des graines de fétuques endophytées (Wagner et al., 2000). Pour les activités glutathion transférase, on note une diminution de conjugaison du DCNB dans les reins à J28 (Fig. b) comme décrit dans une étude sur foie de souris exposées à des graines de fétuque endophytée. (Wagner et al., 2000).

Ce travail a été soutenu par le gouvernement français (Fond Unique Interministériel) et l'État de Midi-Pyrénées sur un projet labellisé par le Pôle de compétitivité français AGRIMIP-INNOVATION.

Burke et al., 2007. J. Anim. Sci., 85, 2932-2940.

Frei et al., 1970. Enzymol. Biol. Clin. 11, 385-401.

Gallagher et Hawkes, 1985. J. Chromatogr., 322, 159-167.

Ghosal et Recknagel 1965. Life sci. 4, 1521-1530.

Habig et al., 1974. J. Biol. Chem. 249, 7130-7139.

Hohenboken et Blodgett, 1997. J. Anim. Sci., 75, 2165-2173.

Kohn et Liverzedge 1944. Pharmacol. Exp. Therap. 82, 292-293.

Lakritz et al., 2002. American J. Vet. Research, 63, 799-803.

Rottinghaus et al., 1991. J. Agric. Food Chem., 39, 112-115.

Settivari et al., 2008. Tox. and Applied Pharm., 227, 347-356.

Settivari et al., 2009. J. Anim. Sci., 87, 3142-3155.

Tor-Agbidye et al., 2001. Vet. Hum. Toxicol., 43, 140-146.

Wagner et al., 2000. J. Anim. Sci., 78, 1191-1198.