



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme CELINE REPUSSARD

le vendredi 5 décembre 2014

Titre :

ETUDES DES FACTEURS DE PRODUCTION D'ALCALOÏDES
TOXIQUES PAR DES EPICHLÔE ENDOPHYTES DE GRAMINÉES
FOURRAGÈRES DANS LE SUD DE LA FRANCE

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Laboratoire de Mycotoxicologie (ENVT)

Directeur(s) de Thèse :

M. PHILIPPE GUERRE

Rapporteurs :

Mme FLORENCE VOLAIRE, UNIVERSITE MONTPELLIER 2
M. PHILIPPE BERNY, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Membre(s) du jury :

M. C. PETIT, , Président

M. CHRISTIAN BARREAU, INRA BORDEAUX, Membre

M. OLIVIER PUEL, INRA TOULOUSE, Membre

M. PHILIPPE GUERRE, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

Remerciements

Je tiens tout d'abord à sincèrement remercier Philippe Guerre, mon directeur de thèse pour sa gentillesse, son immense savoir, ses conseils et sa grande disponibilité.

Je souhaite ensuite remercier Didier Tardieu, pour ses conseils en analytique, son soutien, son encadrement et sa patience.

Un grand merci à Lydie pour ses cours de biochimie, sa bonne humeur et surtout sa « présence » au retour de nos sorties à Saint-Affrique !

Il est impossible pour moi de ne pas remercier mes deux compères de thèse : Zbibou et Emad !!!! Sans vous ces années auraient été un vrai supplice !!! Merci !

Merci à toute l'équipe du lycée agricole de La Cazotte à St Affrique pour sa grande implication dans les différents protocoles expérimentaux et pour l'entretien de « mes » parcelles !!

Comment ne pas remercier toutes les stagiaires qui ont contribué à ce travail : Elodie, Estelle, Marie, Mélanie et Julie, vous avez été formidables !!!

Ce serait une honte d'oublier toutes les personnes avec lesquelles j'ai passé d'excellents moments à l'ENVT. Donc un grand merci à : Nathalie, Petra, Arlette, Marie-Rose, Alain(s), Sylviane, Jean-Denis, Hu, Xhu, Lù et Claudine !

Mille mercis à Lise et Mathieu qui m'ont soutenue à distance !! Bisous les amis !

Merci à Claude Maranges, sans ton soutien ce manuscrit n'existerait pas !!!

Je veux aussi exprimer toute ma reconnaissance aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer cette thèse : Florence Volaire, Philippe Berny, Christian Barreau, Claude Petit et Olivier Puel.

Merci aux membres de mon comité de thèse pour leurs regards pertinents portés sur mon travail : Isabelle Oswald, Florence Forget, Florence Mathieu et Olivier Puel.

Et puis un dernier et énorme MERCI à Nanou pour ton immense soutien et pour avoir supporté durant ces « quelques années » mes humeurs changeantes et mes doutes!!!

Table des matières

Remerciements.....	1
Table des matières	2
Table des figures	3
Table des tableaux	4
Table des encadrés	5
Liste des abréviations.....	6
INTRODUCTION GENERALE	7
CHAPITRE 1	12
Présentation de l'article 1.....	12
Article 1.....	19
CHAPITRE 2	43
Présentation de l'article 2.....	43
Article 2	50
CHAPITRE 3	56
Présentation de l'article 3.....	56
Article 3	58
Présentation de l'article 4.....	65
Article 4	69
Présentation de l'article 5.....	93
Article 5	100
CONCLUSION GENERALE	106
Références bibliographiques	110

Table des figures

Figure 1 : Prélèvements des différentes parties de la plante : a) base ($\approx 5\text{cm}$), b) feuilles et c) épis (inflorescence)..... 45

Figure 2 : Points de prélèvements sur la parcelle à St-Affrique..... 46

Table des tableaux

Tableau 1 : Critères de validation de la méthode de dosage du lolitrème B 56

Table des encadrés

Encadré 1 : Démarche initiale mise en œuvre au début de la thèse	10
Encadré 2 : Démarche finale mise en œuvre au cours de la thèse	11
Encadré 3 : Etude des facteurs modulant la production d'Ergovaline dans la Fétuque élevée	49
Encadré 4 : Etude de populations de Ray grass anglais sauvages	68
Encadré 5 : Etude des facteurs modulant la production de lolitrème B dans Ray grass anglais	99
Encadré 6 : Principaux résultats et perspectives.....	109

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AE : Alcaloïdes Ergotiques

BBCH : Biologische **B**undesanstalt **B**undessortenamt und **CH**emische Industrie

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

CO₂ : Dioxyde de Carbone

EDB : Laboratoire Evolution et Diversité Biologique

ENFA : Ecole Nationale de Formation Agronomique

ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

EV : Ergovaline

FE : Fétuque Elevée (*Lolium arundinaceum*)

GPS : Global positioning system

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

ID : Indole-Diterpène

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

JO : Journal Officiel

L : Lolines

LB : Lolitrème B

Ltm+ : Endophyte génétiquement compétent ⇔ possédant les gènes des voies de biosynthèse

MS : Matière Sèche

N : Azote

NAL : N-Acétylloline

NFL : N-Formylloline

NJP : Nombre de jours de précipitations annuels

P : Péramine

PJE : Nombre de jours de précipitations en juillet

PJH : Nombre de jours de précipitations en janvier

PRA : Rapport entre les abats d'automne (septembre + octobre) et ceux de juillet

RAGT : Rouergue Auvergne Gévaudan Tarnais

RGA : Ray Grass Anglais (*Lolium perenne*)

TMX : Nombre de jours avec une température supérieure à 30°C

UMR : Unité Mixte de Recherche

UPS : Université Paul Sabatier

INTRODUCTION GENERALE



Introduction générale

Certains champignons du genre *Epichloë*, anciennement appelés *Neotyphodium*, ont un développement endophyte (intercellulaire) dans différentes graminées fourragères. Ces associations symbiotiques sont nombreuses, néanmoins deux d'entre elles sont particulièrement étudiées depuis près d'une quarantaine d'années : *Lolium arundinaceum* (Fétuque élevée)/*Epichloë coenophiala* et *L. perenne* (Ray grass anglais)/*E. festucae* var. *lolii*. L'intérêt particulier porté à ces graminées endophytées découle principalement d'une meilleure capacité de la plante endophytée à résister à divers stress biotiques (ravageurs de culture) et abiotiques (sécheresse, déficit/excès en minéraux, contamination du sol, etc.). Cet avantage est en partie lié à la synthèse de mycotoxines de la classe des alcaloïdes comme la péramine et les lolines aux propriétés insecticides, nématocides et répulsives contre de nombreux insectes. D'autres toxines peuvent également être synthétisées, comme l'ergovaline (EV) et le lolitrem B (LB), et sont à l'origine de cas de toxicité graves chez les animaux pâturant (ovins, bovins, etc.). Du fait de nombreux cas d'intoxications certains pays comme l'Australie et la Nouvelle-Zélande ont développé des associations graminée/endophyte dans lesquelles la souche mycélienne est non toxigène. Dans le contexte actuel de l'élevage français marqué par la nécessité de réduire les intrants, l'augmentation du coût des matières premières, le réchauffement climatique, et la diminution générale des surfaces agricoles il est apparu intéressant de se poser la question du rapport bénéfices/risques liés à l'utilisation de graminées fourragères endophytées (encadré 1, p.10).

Cette problématique a donné lieu à la création d'un projet (INNOV'HERBA) en 2009 dans lequel collaboraient différents partenaires publics (INRA, ENVT) et privés (RAGT, Société des caves, Confédération Roquefort). Le travail de thèse qui m'était initialement proposé s'ancrait à différents niveaux de ce projet (encadré 1, p.10) :

- ☞ Principalement une étude de la toxicité des alcaloïdes d'endophytes du genre *Epichloë* sur les ovins laitiers et de la présence de résidus dans les produits animaux en collaboration avec les équipes « Xénobiotique » de l'ENVT et la Cazotte (lycée agricole de Saint-Affrique, Aveyron), (70% du travail estimé)
- ☞ Egalement le dosage par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) des mycotoxines d'intérêt (EV et LB) conduisant à la collaboration avec différents

partenaires (équipe EDB de l'UMR 5174 UPS-CRNS-ENFA, équipe « Orphée » de l'UMR Agir (Inra)) sur diverses thématiques du projet (criblage des graines, dosages des toxines pendant les essais toxicologiques sur ovins laitiers et en croissance et une étude de la production des toxines) (30% du travail estimé).

Après une année de thèse ces travaux ont notamment conduit à la publication d'un article concernant la mise au point d'une méthode HPLC simple et rapide pour doser le LB dans différentes matrices végétales ([article 2, p.50](#)). Le travail en collaboration avec l'EDB a permis d'étudier la répartition de graminées (fétuque élevée et ray grass anglais) endophytées toxigènes des prairies naturelles du Sud Ouest de la France ([article 4, p.69](#)). Néanmoins les **premiers essais de toxicité sur ovins laitiers réalisés en 2010 n'ont pas donné les résultats attendus**. Les **teneurs en EV et LB** mesurées au champ **dans les graminées réputées très toxigènes** utilisées dans cet essai se sont révélées **très inférieures aux concentrations attendues** décrites dans la littérature dans d'autres pays et annoncées par certains partenaires du projet. Cette observation a abouti à de nouvelles interrogations concernant la production de mycotoxines par ces associations plante-champignon en France : **i)** les parties de la plante hôte distribuées aux ovins sont-elles les plus concentrées en toxines ?, **ii)** quelle est la variabilité saisonnière des teneurs en EV et LB ?, **iii)** quel est l'impact des conditions agro-environnementales de culture à St Affrique sur la concentration en EV et en LB dans les fourrages endophytés ?

Pour répondre à ces nouvelles interrogations mon travail de thèse au cours des années 2011 à 2013 s'est donc recentré sur l'étude de certains facteurs abiotiques pouvant moduler la production d'EV et de LB dans les graminées fourragères dans le Sud de la France (encadré 2, p.11). Pour cela les différents essais en cours ont été utilisés pour générer de nouvelles données. Les parcelles semées en 2009 à St Affrique (Aveyron) pour les essais *in vivo* sur ovins ont pu être utilisées pour décrire et tenter d'expliquer la faible production de mycotoxines dans la fétuque élevée et le ray grass anglais en 2010. La répartition des teneurs dans la plante, les variations des teneurs en toxines au cours du temps, le suivi de certaines données climatiques (pluviosité, températures minimales et maximales) ou encore la disponibilité des substrats pour les voies de biosynthèse ont alors été explorés. Les résultats obtenus dans ces travaux devaient être comparés à ceux observés en conditions contrôlées. Le suivi mis en place sur ces deux graminées fourragères a permis la publication d'un article sur la production d'EV dans la fétuque élevée dans le Sud Ouest de la France ([article 3, p.58](#)) et la rédaction d'un deuxième

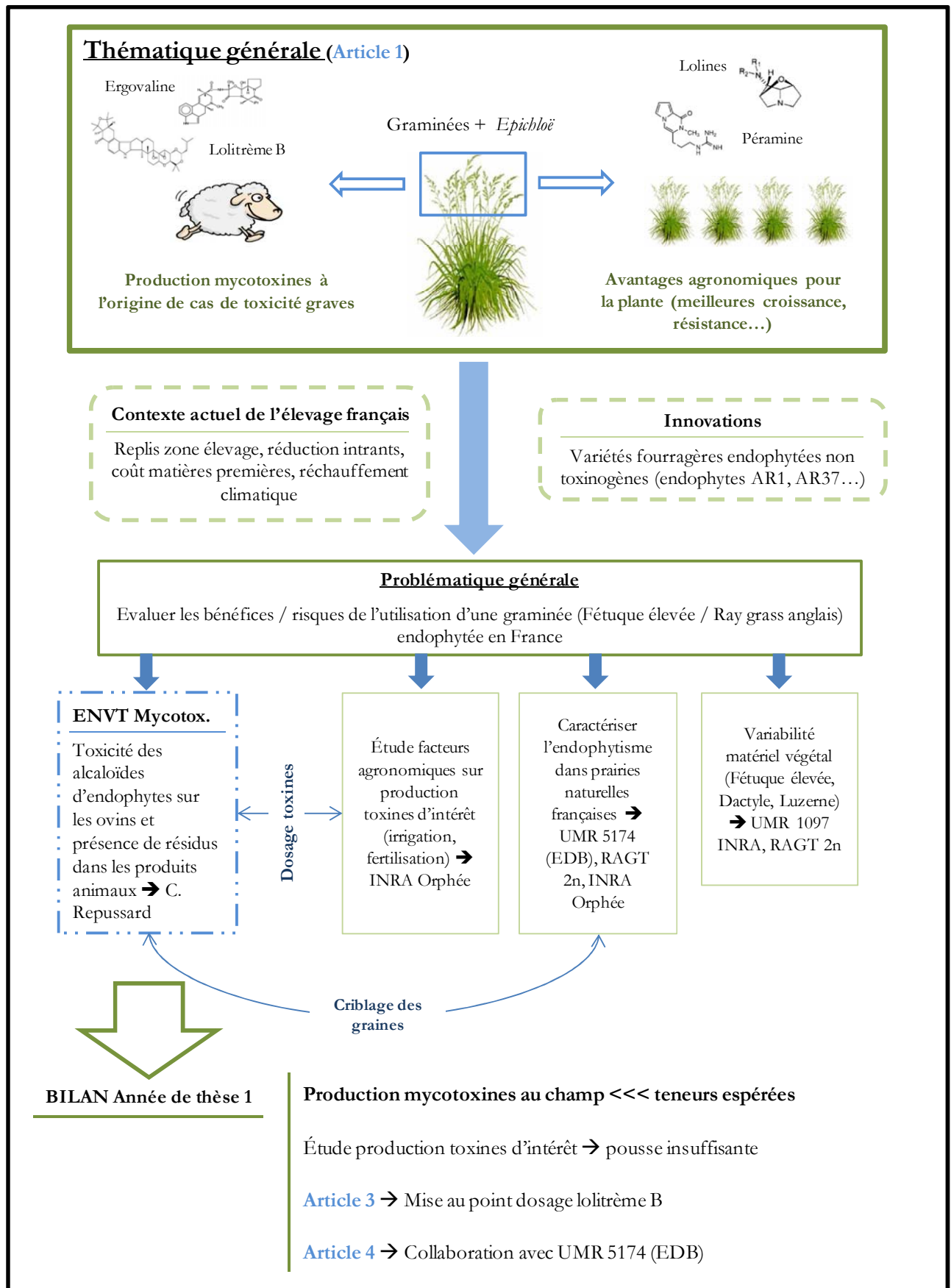
sur les variations des concentrations en EV et LB dans le ray grass anglais ([article 5, p.100](#)). L'étude des facteurs agronomiques sous conditions contrôlées n'a pas donné de résultats principalement en raison de problèmes liés à l'implantation des plants endophytés.

La présentation de mon travail de thèse est composée de cinq articles qui peuvent être regroupés en trois chapitres. Le premier concerne une étude bibliographique qui fournit les éléments de compréhension de la problématique ([article 1](#)). L'objectif de cette analyse a été de : **i**) présenter la nature des champignons endophytes notamment la forme anamorphe du genre *Epichloë* (anciennement *Neotyphodium*) et les conditions de leur développement général (diversité, répartition, influence sur le développement de la plante hôte, etc.), **ii**) présenter les mycotoxines produites par ces champignons (diversité, voies de biosynthèse, distribution dans la plante, rôles écologiques, etc.) et **iii**) présenter la problématique française liée aux endophytes (graminées sauvages endophytées, cas d'intoxication, etc.).

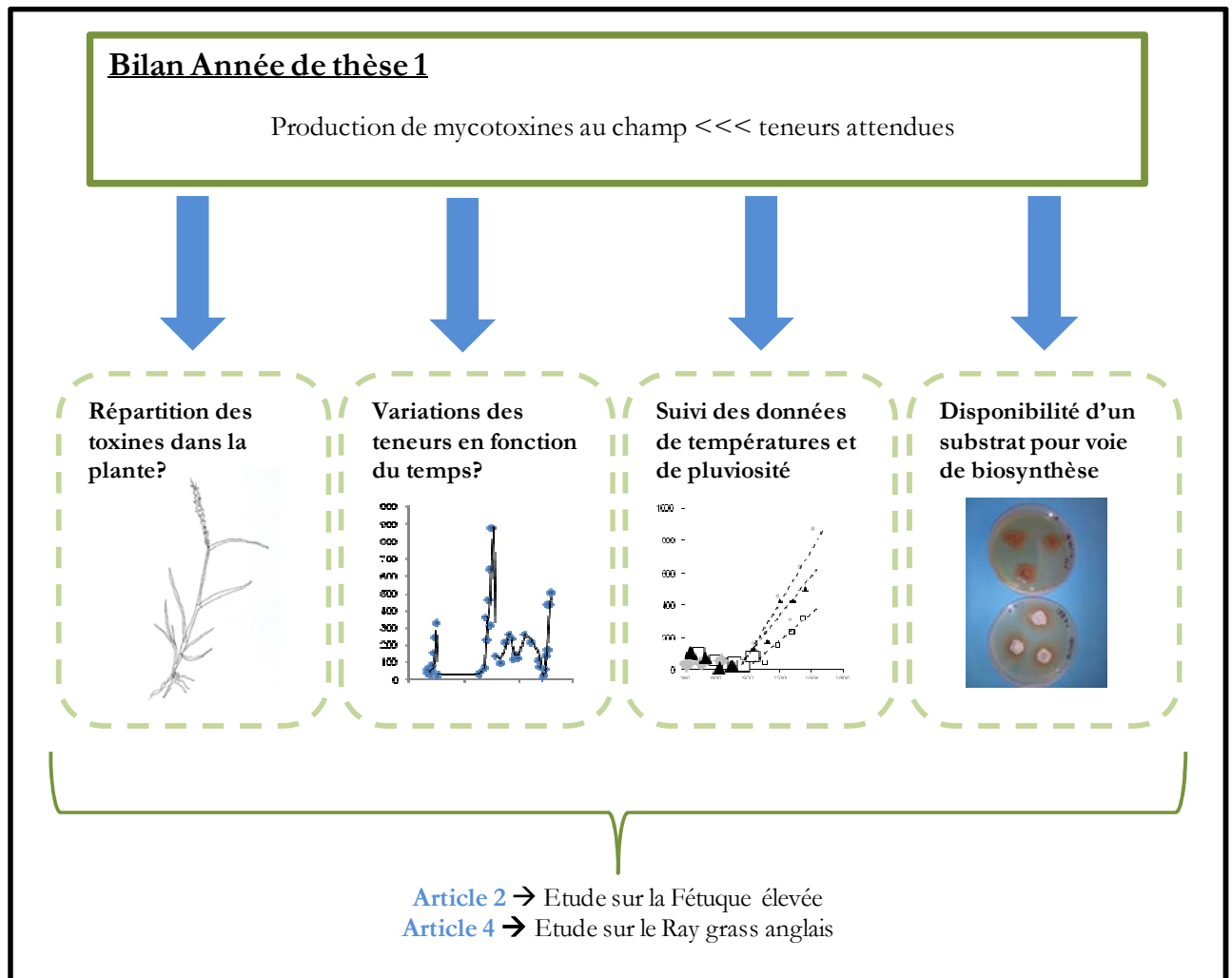
Dans un deuxième chapitre, l'[article 2](#) a pour objectif de présenter certains facteurs pouvant moduler la production d'EV dans des fétuques élevées endophytées. Cet article s'articule autour de deux études : la première visant à étudier la répartition de souches endophytées toxigènes dans le Sud Ouest de la France et la deuxième évaluant l'influence des conditions agro-climatiques de l'essai sur la synthèse d'EV.

Le troisième et dernier chapitre présente les résultats obtenus sur le ray grass anglais et comporte trois articles. Le premier ([article 3](#)) correspond à la méthode de dosage par HPLC du LB mise au point dans notre laboratoire. Le deuxième ([article 4](#)), rédigé en collaboration avec l'équipe de l'EDB, est consacré aux analyses effectuées sur des ray grass anglais sauvages collectés dans le Sud Ouest de la France. L'objectif de cet article est d'évaluer l'influence des conditions environnementales des différents lieux de collecte sur la prévalence de l'endophyte et sur sa capacité à synthétiser du LB. Enfin le dernier article ([article 5](#)) est consacré à l'influence de certains facteurs abiotiques (pluie, température, azote) sur la synthèse d'EV et de LB dans le ray grass anglais dans le Sud Ouest de la France.

La conclusion générale de cette présentation permet de lier l'ensemble des résultats obtenus tout au long de mon travail de thèse pour mieux comprendre l'endophytisme dans le Sud Ouest de la France.

Encadré 1 : Démarche initiale mise en œuvre au début de la thèse

Encadré 2 : Démarche finale mise en œuvre au cours de la thèse



CHAPITRES



La partie de la thèse qui suit est organisée en trois chapitres :

- ☞ Chapitre 1 : Il correspond au premier article concernant une étude bibliographique permettant la compréhension du sujet.
- ☞ Chapitre 2 : Il correspond au deuxième article présentant les études effectuées sur la Fétuque élevée.
- ☞ Chapitre 3 : Il correspond aux trois derniers articles présentant les différentes études réalisées sur le Ray Grass anglais.

Chaque article est précédé d'une présentation en français expliquant brièvement le contexte scientifique dans lequel il se situe et d'un résumé rédigé en français.

L'article, rédigé en anglais (ou en français, article 1), constitue le corps du chapitre. Il est à noter que les titres et les numéros de figures à l'intérieur des articles leur sont propres et ne sont pas dans la continuité du manuscrit.

La bibliographie de chaque article a été incluse dans la bibliographie générale du manuscrit.

CHAPITRE 1

Etude bibliographique



Présentation de l'article 1

Le qualificatif « endophyte » est donné à des microorganismes qui se développent à l'intérieur d'un végétal pour tout ou partie de leur cycle de vie (Saikkonen et al., 2004). Il existe ainsi des champignons, bactéries, algues et insectes endophytes. Ce mode de vie particulier se différencie d'un développement « parasite » dans la mesure où la plante et le micro-organisme tirent un bénéfice réciproque de l'association. Dans le cas des champignons endophytes, ce développement peut s'accompagner de la production de mycotoxines, notamment toxiques pour le bétail. L'objectif de cet article de revue bibliographique est de présenter les facteurs généraux qui vont conduire à la production de ces composés, afin notamment de dégager des hypothèses permettant de comprendre les différences de prévalence des toxines et des maladies chez les animaux de production.

Découverts il y a plusieurs décennies les champignons endophytes de graminées sont des organismes microscopiques généralement intercellulaires (Bacon & De Battista, 1990 ; Rodriguez et al., 2009). La famille des *Clavicipitaceae* est la plus représentée et est étroitement liée à plus d'une centaine d'espèces végétales de la famille des *Poaceae*. Présents sur tous les continents ces organismes mycéliens colonisent des plantes hôtes utilisées dans l'alimentation humaine ou animale, les gazons, les prairies naturelles (article 1, tableau I, p.20)... Ces associations plante-champignon sont souvent de type mutualiste et peuvent conduire à la production de mycotoxines (Kuldau & Bacon, 2008). Le genre *Neotyphodium* nouvellement *Epichloë* (Leuchtman et al., 2014) est étudié depuis de nombreuses années car le champignon permet à la graminée de mieux résister à divers stress abiotiques (déficit hydrique, forte température, carence azotée...) et présente ainsi un intérêt en agronomie (Arachevaleta et al., 1989 ; Lewis, 2004). Le développement symbiotique conduit également à la production de différentes mycotoxines de la classe des alcaloïdes, certaines toxiques pour les insectes, donc d'intérêt agronomique, et d'autres toxiques pour les animaux herbivores.

La forme anamorphe des *Epichloë* anciennement *Neotyphodium* vit en symbiose avec des plantes appartenant uniquement à la sous famille des *Pooideae*. Plus d'une cinquantaine d'espèces anciennement *Neotyphodium* ont été identifiées, et des populations de graminées sauvages endophytées ont été détectées sur tous les continents (article 1, figure 1, p.21) (Schardl et al., 2012). Le taux d'endophytisme atteint 100% pour certaines populations de fétuque élevée en

Afrique du Nord (Clement et al., 2001). La reproduction strictement asexuée de ces champignons (la transmission de ces champignons est verticale, de la plante mère à la plante fille) explique ces forts taux d'endophytisme (Clay & Schardl, 2002).

La présence des *Epichloë* anamorphes dans l'espace intercellulaire de la plante hôte leur assure protection et source de nutriments (Müller & Krauss, 2005). Les composés organiques absorbés (mécanismes actifs) par le champignon servent également à la production de divers métabolites secondaires comme des mycotoxines, des enzymes ou des hormones végétales (Kuldau & Bacon, 2008).

Certaines activités métaboliques de la graminée (photosynthèse, conductance stomatique...) peuvent être modifiées par la synthèse de ces métabolites secondaires notamment les hormones et les enzymes (Lam et al., 1995). Chez des variétés d'intérêt agronomique comme la fétuque élevée (*Lolium arundinaceum*) ou le ray grass anglais (*L. perenne*) plusieurs études ont été menées afin de mesurer l'impact de l'endophyte sur leur rendement. Des travaux en conditions contrôlées, notamment sous serre, ont mis en évidence une amélioration de la croissance, de la production de graines et du rendement photosynthétique de la graminée endophytée (Latch et al., 1985 ; Monnet et al., 2005). Des résultats beaucoup plus hétérogènes ont été obtenus avec d'autres types d'associations *Epichloë* –graminée (Keogh & Lawrence, 1987 ; Spiering et al., 2006). En effet dans certains cas le coût de l'infection l'emporte sur les possibles avantages que la plante peut en retirer. Au final, l'influence de l'endophyte sur la croissance des plantes hôtes est controversée et semblerait dépendre des différences de conditions environnementales.

Au cours de leur développement symbiotique dans la graminée, les *Epichloë* peuvent synthétiser une grande diversité de mycotoxines de la classe des alcaloïdes dont certaines peuvent être à l'origine d'intoxications du bétail (Cheplick & Faeth, 2009 ; Faeth, 2002). Quatre groupes de toxines ont été identifiés (article 1, tableau III, p.25) (Kuldau & Bacon, 2008) :

Les alcaloïdes de l'ergot (AE) : Les ergopeptines sont les plus fréquemment produites par *Epichloë* et plus particulièrement l'ergovaline (Lyons et al., 1986). Cette molécule est même l'AE majoritaire dans la fétuque élevée (*L. arundinaceum*, FE) et le ray grass anglais (*L. perenne*, RGA) (Lyons et al., 1986 ; TePaske & Powell, 1993). Ce groupe de mycotoxines est considéré comme responsable des cas de « fescue toxicosis » chez des mammifères consommant de la fétuque élevée (Yates et al., 1985). Les manifestations toxiques chez l'animal varient en fonction de la

température ambiante et se caractérisent par des nécroses des extrémités en hiver et une baisse des performances en été (Zbib et al., 2014).

Les indole-diterpènes (ID) : Les *Epichloë* sont capables de synthétiser 9 types structuraux d'ID du groupe de la paxilline dont les lolitrèmes qui sont les plus abondants (Saikia et al., 2008). Différentes études ont mis en évidence que le principal lolitrème produit dans le ray grass anglais en symbiose avec *E. festucae* var. *lolii* est le lolitrème B (Munday-Finch et al., 1995). Cet ID est à l'origine de désordres neuromusculaires appelés « ryegrass staggers » chez des animaux pâturant du ray grass anglais endophyté (Zbib et al., 2014).

Les lolines (L) : Sept mycotoxines appartenant au groupe des lolines peuvent être synthétisées par les *Epichloë* (Blankenship et al., 2001). Les deux les plus fréquemment produites dans les graminées endophytées sont la N-formylloline (NFL) et la N-acétylloline (NAL) (TePaske & Powell, 1993). Ces alcaloïdes ont des propriétés insecticides et nématocides (Cheplick & Faeth, 2009 ; Riedell et al., 1991).

La péramine (P) : La péramine est l'alcaloïde le plus fréquemment synthétisé par des *Epichloë* en association avec des *Pooideae* (Siegel et al., 1990). Elle possède des propriétés toxiques et répulsives contre de nombreux ravageurs de culture (Kuldau & Bacon, 2008).

L'étude de la croissance des *Epichloë* dans la plante hôte à partir de la graine semée révèle que le champignon colonise le végétal selon un gradient de concentration décroissant allant de la partie apicale vers la base (Herd et al., 1997). Les analyses de la distribution en mycotoxines dans la plante mettent en évidence que toutes ne se répartissent pas de la même manière (article 1, figure 8, p.29). Leur accumulation dépend de la molécule, du génotype de la graminée et du type de tissu végétal (Koulman et al., 2007 ; Spiering et al., 2005b). L'ergovaline se concentre ainsi principalement dans les tiges et les gaines foliaires des feuilles d'âge intermédiaire (Spiering et al., 2005b) alors que la péramine est répartie de manière homogène dans la plante hôte (Keogh et al., 1996). Quelque soit le type d'alcaloïde les graines sont le tissu contenant le maximum de toxine (Ball et al., 1997 ; Justus et al., 1997 ; Royslance et al., 1994). **La période à laquelle la plante sera consommée, ou récoltée, peut donc constituer un élément clef dans l'appréciation du risque mycotoxique pour l'animal.**

La nature et la quantité de mycotoxines produites dans une graminée endophytée dépend aussi du génotype du champignon. L'organisme mycélien sera ou non pourvu du matériel génétique

nécessaire à la production d'alcaloïdes (Bony et al., 2001b). Le génotype de la plante détermine également la synthèse de toxines (Hahn et al., 2008). Par exemple *Neotyphodium starrii* produit des AE avec *Bromus anomalus* alors qu'il n'en produit pas lorsqu'il est associé à *Festuca obtusa*. **Des différences de répartition des différents génotypes de champignon et de plante constituent donc un deuxième élément clef dans l'appréciation du risque mycotoxique pour l'animal.** La présence d'endophyte étant synonyme d'un possible risque mycotoxique des variétés fourragères endophytées dans lesquelles le génotype d'*Epichloë* utilisé est non toxigène ont ainsi été développées et commercialisées sur différents continents, mais pas en France (Fletcher, 2012).

Enfin, différents facteurs extrinsèques peuvent également influencer la production de mycotoxines. De nombreux facteurs abiotiques (eau, température, minéraux, CO₂ atmosphérique, ultraviolets, pH du sol, pâturage, fauche...) peuvent ainsi modifier les effets de l'endophyte sur le développement végétal de la graminée hôte et/ou influencer la synthèse de mycotoxines par les *Epichloë*. Différentes conditions stressantes (sécheresse, apports minéraux dans le sol, modification du pH du sol...) ont été testées sur des variétés agronomiques endophytées comme la fétuque élevée et le ray grass anglais (e.g. West et al., 1993). Des résultats contradictoires ont été obtenus sur différents paramètres de croissance végétale lors de différentes études sous serre (article 1, tableau II, p.24). Par exemple les températures élevées n'influencent pas la croissance du RGA endophyté (Eerens et al., 1998a) alors des teneurs élevées en CO₂ atmosphérique élevées améliorent le développement de FE endophytées (Hunt et al., 2005). Ces différences dans les résultats sont encore plus marquées avec d'autres associations plante-endophyte (Lewis et al., 1997 ; Morse et al., 2002). L'amélioration de la tolérance à divers stress environnementaux n'est pas clairement démontrée mais la présence importante d'association graminée- *Epichloë* dans les écosystèmes naturels stressants le suggère (Lewis et al., 1997).

En conditions normales, la biosynthèse d'alcaloïdes varie en fonction des saisons. Les teneurs en toxines (ergovaline, lolitrème B, lolines) suivent le développement végétal de la graminée toute l'année quelque soit le type d'association plante-endophyte (Roylance et al., 1994). Seules les teneurs en péramine varient peu tout au long de l'année (Ball et al., 1995). L'influence de nombreuses conditions stressantes sur la synthèse de toxines a été principalement évaluée sur la FE et le RGA sous atmosphère contrôlée (article 1, tableau IV, p.30). Les résultats obtenus sont très hétérogènes et contradictoires. Ils varient d'une toxine à l'autre ou pour une même

toxine. Par exemple des apports en azote élevés peuvent faire augmenter ou diminuer les teneurs en péramine dans la plante hôte (Krauss et al., 2007) mais n'ont aucune influence sur la production de lolitrème B (Hunt et al., 2005). Les conditions expérimentales variables, la concentration en endophyte *per se* ou les voies de biosynthèse *per se* peuvent expliquer ces différences d'effets. Néanmoins, on peut retenir de ces travaux que **les conditions agronomiques spécifiques de culture qui existent dans différents pays, régions, ou exploitations, peuvent être un facteur important de variation des teneurs en mycotoxines dans la plante.**

La caractérisation du danger et l'appréciation du risque mycotoxique passent par le dosage de ces composés. Les alcaloïdes produits par *Epichloë* peuvent être quantifiés dans différents tissus : animaux et végétaux. De nombreuses techniques ont été mises au point depuis une trentaine d'années. Ce sont principalement des méthodes chromatographiques comme la chromatographie liquide à haute performance ou la chromatographie en phase gazeuse couplée ou non à une chromatographie de masse (Moyano et al., 2009 ; Rottinghaus et al., 1991). La sensibilité des différentes méthodes validées varie selon la mycotoxine dosée, et les techniques mises en œuvre. La détection en fluorimétrie permet, quand elle est disponible, d'atteindre des limites de détection suffisamment basses pour permettre un dosage dans les produits animaux (Durix et al., 1999 ; Miyazaki et al., 2004). Le développement de techniques de routine en spectrométrie de masse a été réalisé pour les alcaloïdes ergotiques produits au cours du développement de l'ergot du seigle, dont certains sont également produits par les moisissures endophytes. Qu'elle que soit la méthode utilisée et sa limite de détection, la quantification des toxines dans les plantes hôtes est en général possible.

Bien que des plantes endophytées soient retrouvées sur tous les continents depuis des décennies, ce n'est que vers la fin des années 80 que la France va s'intéresser aux champignons endophytes du genre *Epichloë*. L'origine de cet intérêt est liée à la mise en évidence du champignon dans de nombreux lots commerciaux de semences, aucun cas de mycotoxicoses associées n'étant rapporté. Différentes études vont alors porter sur la présence d'*Epichloë* sauvages, et la recherche de cas de toxicoses en France qui auraient été non diagnostiqués dans les conditions habituelles d'exercice vétérinaire.

Plusieurs études ont mis en évidence que de nombreuses graminées sauvages étaient endophytées (e.g. Gonzalo-Turpin et al., 2010). De nombreuses espèces ont été collectées. Ces

études ont révélé que 70% de RGA issus de 57 populations sauvages récoltées dans toute la France étaient endophytés (Lewis et al., 1997). Les taux d'endophytisme varient de 0 à 100% selon les populations d'une même espèce végétale ou selon les différentes espèces végétales. La production de mycotoxines dans des graminées sauvages endophytées a été peu étudiée. Une étude sur des RGA a mis en évidence des teneurs en lolitrème B élevées (près de 6 mg/kg MS) soit des concentrations 6 fois supérieures à celles d'échantillons allemands (Bony et al., 2001b ; Oldenburg, 1987). Cependant très peu de cas de toxicoses ont été dénombrés. Seuls deux cas ont été suspectés chez des bovins pâturant des prairies monospécifiques de FE contenant entre 15 et 50% d'endophyte en hiver ou en été (Iceaga, 1992). Aucun dosage de toxine n'a malheureusement été effectué pour confirmer l'hypothèse étiologique et exclure une intoxication par l'ergot du seigle, qui peut également être présent dans les graminées fourragères. Les quelques cas de « ryegrass staggers » répertoriés sur le territoire national concernaient des bovins pâturant du RGA endophyté à 30% (Bony et al., 1998) et d'autres ayant consommé des pailles de RGA cultivé pour les semences fourragères (Benkhelil et al., 2004). Les teneurs en lolitrème B étaient soit inférieures soit supérieures aux seuils réputés toxiques pour les bovins (entre 1800 et 2000 µg/kg matière sèche) (Tor-Agbidye et al., 2001).

Les quantités d'ergovaline, de lolitrème B et de péramine quantifiées dans l'étude des RGA sauvages en France sont comparables à celles fréquemment rencontrées aux Etats-Unis et en Nouvelle-Zélande (e.g. Bony et al., 2001b ; Bush et al., 1997). En conditions expérimentales avec des cultivars de FE ou de RGA endophytés les variations saisonnières de teneurs en alcaloïdes sont similaires à celles observées outre-Atlantique et en Océanie (e.g. Durix et al., 1998 ; Roylance et al., 1994). Les niveaux les plus élevés ont été observés dans des conditions de pire cas c'est-à-dire lors de récolte tardive, après floraison (e.g. Ball et al., 1997).

Différentes hypothèses peuvent ainsi être émises pour expliquer le faible nombre de cas de mycotoxicoses observé en France alors que les populations de graminées sauvages présentent des taux d'infection élevés pouvant atteindre 100% de plantes endophytées. Certaines de ces hypothèses sont liées à la plante et au couple plante-endophyte, qui pourrait se révéler faiblement producteur de toxines, et ce pour des raisons biotiques (voies de biosynthèse manquantes ou incomplètes) ou abiotiques (conditions de pousse peu favorables à la production de mycotoxines). D'autres hypothèses sont liées à l'animal, qui pourrait ne pas être exposé aux toxines (refus de consommation sur prairies naturelle) ou être plus résistant pour

des raisons génétiques (voies métaboliques différentes). Les différents travaux réalisés au cours de ma thèse ont principalement porté sur la connaissance des facteurs liés à la plante endophytée, qu'il s'agisse de son potentiel toxigène ou de l'impact des facteurs pédo-climatiques sur la production de toxines dans les conditions de culture françaises.

Article 1

Les champignons endophytes du genre *Neotyphodium* et leurs toxines : généralités et problématique française.

Repussard C., Zbib N., Tardieu D., Guerre P.

Université de Toulouse, INP, ENVT, UR Mycotoxicologie, F-31076 Toulouse, France

Mots clés

Neotyphodium, symbiose, avantages, mycotoxines, France

Article publié en 2013 dans la Revue de Médecine Vétérinaire, vol. 164, 583-606.

Les champignons endophytes du genre *Neotyphodium* et leurs toxines : généralités et problématique française.

REPUSSARD C., ZBIB N., TARDIEU D., GUERRE P.*

Laboratoire Mycotoxicologie, Université de Toulouse, INPT, ENVT, F-31076 Toulouse, France

* Auteur chargé de la correspondance : p.guerre@envt.fr

RESUME

Les champignons endophytes du genre *Neotyphodium* se développent en symbiose avec de nombreuses graminées. Les avantages agronomiques apportés par les microorganismes (amélioration de la croissance, de la reproduction...) à la plante diffèrent selon la présence et l'absence de facteurs de stress (fortes températures, sécheresse...). Ce type d'association peut être à l'origine de la production de mycotoxines toxiques pour les animaux pâturant. Leur synthèse dépend de nombreux paramètres intrinsèques et extrinsèques. En France, bien qu'un taux important d'endophytisme soit rapporté sur des variétés sauvages de graminées, très peu de cas de toxicoses ont été répertoriés.

Mots clés : *Neotyphodium*, symbiose, avantages, mycotoxines, France

Les endophytes sont des microorganismes qui se développent à l'intérieur d'un végétal pour tout ou partie de leur cycle de vie [136, 156]. On les retrouve parmi les champignons [156], bactéries [128], algues [115] et insectes [50]. Présents sur tous les continents [30], ils entretiennent avec le végétal différents types d'interactions telles que le parasitisme, le mutualisme, le commensalisme ou encore la symbiose [146]. Les plantes bénéficient de la présence de certains endophytes qui favorisent leur croissance [34] et leur confèrent une meilleure résistance à divers pathogènes [29], en partie grâce à la production d'antibiotiques ou de mycotoxines [44]. En ce qui concerne les champignons endophytes du genre *Neotyphodium*, en symbiose avec des graminées fourragères, on constate la production de mycotoxines (alcaloïdes) qui est un frein à l'utilisation de variétés agronomiques d'intérêt. Ce problème est en partie contourné par le développement de variétés exploitant des champignons endophytes non producteurs de mycotoxines toxiques pour les mammifères (AR1, AR542...), mais conservant des propriétés insecticides et répulsives [51].

L'objectif de cet article est de présenter les champignons endophytes des graminées et plus particulièrement ceux appartenant au genre *Epichloe* / *Neotyphodium*, les mycotoxines pouvant être produites par ce genre et la problématique française dans un contexte actuel d'élevage et de production fourragère de moins en moins favorable.

SUMMARY

Endophytic fungi of the genus *Neotyphodium* and their toxins: general and french context.

Endophytic fungi of the genus *Neotyphodium* live in symbiosis with many grasses. Agronomic benefits of microorganisms (improved growth, reproduction ...) to the plant depend on the presence and absence of stress factors (high temperatures, drought ...). This type of association may be responsible for the production of toxic mycotoxins for grazing animals. Their synthesis depends on many intrinsic and extrinsic parameters. In France, although a high rate of endophytism be reported on wild grass varieties, very few cases of toxicosis were identified.

Keywords: *Neotyphodium*, symbiosis, benefits, mycotoxins, France

Les champignons endophytes de graminées

Les champignons endophytes sont souvent définis comme « des organismes mycéliens dont le cycle de vie s'effectue au sein des parties aériennes d'une plante hôte (feuilles, tiges, graines), formant ainsi des associations non pathogènes, systémiques et généralement intercellulaires » [2]. Ces organismes ont été découverts il y a plusieurs décennies [96], mais l'importance écologique de ce type d'association n'a été mise à jour que récemment [28]. Cette première partie permet d'aborder quelques généralités concernant les champignons endophytes des graminées puis de présenter le genre *Neotyphodium* et son impact sur le développement de la plante hôte.

GÉNÉRALITÉS

Les champignons endophytes des graminées les plus fréquents appartiennent à 7 genres de la famille des *Clavicipitaceae*, tribu *Balansiae* (division *Ascomycota*, Hawksworth et al., 1995) : *Atkinsonella*, *Balansia*, *Epichloë*, *Myriogenospora*, *Neotyphodium*, *Nigrocornus* et *Parepichloë* [24]. Ils vivent en lien étroit avec plus d'une centaine d'espèces végétales appartenant à la famille des *Poaceae*. Entre 20 et 30% des graminées dans le monde seraient colonisés [24]. Le tableau 1 illustre pour les différents genres le végétal infecté avec son usage (fourrage, ornement, etc.). Il est possible de

Genre fongique	Genres des espèces végétales associées	Nature / Usage du végétal
<i>Atkinsonella</i>	<i>Danthonia</i> <i>Stipa</i>	Prairies naturelles Prairies naturelles, steppes arides
<i>Balansia</i>	<i>Andropogon</i> <i>Cenchrus</i> <i>Panicum</i> <i>Paspalum</i> <i>Sporobolus</i> <i>Tridens</i>	Prairies naturelles Lutte érosion zones sèches et arides Fourrage, lutte érosion, agro carburant Fourrage, gazon, prairies pampa Gazon, fourrage, milieux secs et chauds Ubiquiste
<i>Epichloë</i>	<i>Agrostis</i> <i>Anthoxanthum</i> <i>Brachypodium</i> <i>Brachyelytrum</i> <i>Bromus</i> <i>Dactylis</i> <i>Elymus</i> <i>Festuca</i> <i>Glyceria</i> <i>Lolium</i> <i>Poa</i>	Gazon, bio filtration, prairies naturelles Prairies naturelles Prairies naturelles, zones tempérées à subtropicales Prairies naturelles Fourrage, céréale, prairies naturelles Fourrage, prairies naturelles Fourrage, prairies naturelles Fourrage, prairies naturelles Prairies naturelles Fourrage, prairies naturelles Gazon, prairies naturelles
<i>Myriogenospora</i>	<i>Andropogon</i> <i>Panicum</i> <i>Paspalum</i>	Prairies naturelles Fourrage, lutte érosion, agro carburant Fourrage, gazon, prairie pampa
<i>Neotyphodium</i>	<i>Achnatherum</i> <i>Bromus</i> <i>Echinopogon</i> <i>Festuca</i> <i>Lolium</i> <i>Melica</i> <i>Poa</i> <i>Triticum</i>	Prairies naturelles Fourrage, céréale, prairies naturelles Prairies naturelles Fourrage, prairies naturelles Fourrage, prairies naturelles Prairies naturelles Gazon, prairies naturelles Alimentations humaine et animale
<i>Nigrocornus</i>	<i>Bothryochloa</i> <i>Cynodon</i> <i>Sorghum</i>	Fourrage, prairies naturelles Gazon Alimentations humaine et animale, agro carburant
<i>Parepichloë</i>	<i>Andropogon</i> <i>Eragrostis</i> <i>Sasa</i>	Prairies naturelles Alimentations animale et rarement humaine Construction, fabrication meubles

TABLEAU I : Exemples de champignons endophytes et plantes hôtes [24, 144]

retrouver ce type de champignons dans des plantes destinées à l'alimentation animale ou humaine, aux prairies naturelles, aux gazons. Chaque espèce mycélienne peut infecter plusieurs espèces végétales mais certaines sont spécifiques d'un genre et/ou d'une espèce de graminée [78]. Occasionnellement une plante hôte peut être colonisée par plusieurs endophytes et offrir la possibilité d'hybridations fongiques [140].

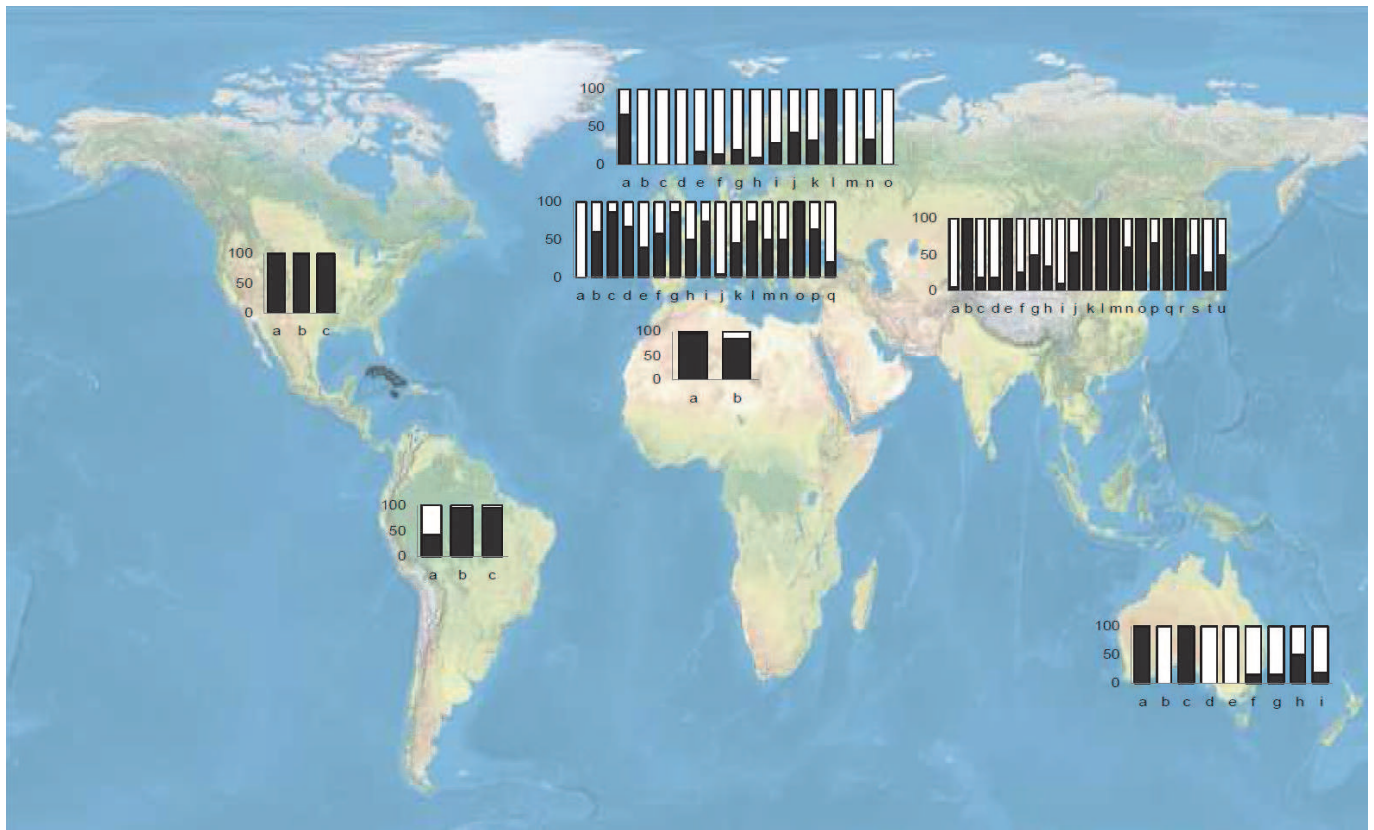
Les associations plante- champignon sont le plus souvent assez stables tout au long de la vie de la plante [28]. Elles sont souvent considérées comme mutualistes même si trois types d'interactions peuvent être constatées [170] :

- Type I antagoniste : la phase de reproduction sexuée de la plante est supprimée par la formation de stromas épiphytes sur les inflorescences en développement. Ceci permet la transmission horizontale du champignon endophyte via une phase de reproduction sexuée et la libération d'ascospores. Les symptômes sont typiques et connus sous le nom de

« quenouille » en français ou « choke » (étrangleur) en anglais. Quelques exemples de ce genre d'association sont *Epichloë typhina* et *Dactylis glomerata* L., *E. glyceriae* et *Glyceria striata*.

- Type II pleiotropique : les stromas se forment sur certaines tiges alors que sur d'autres le champignon se développe dans l'inflorescence qui produit des graines infectées. Cette association, intermédiaire entre les types I et III, est assez fréquente, c'est le cas de *E. festucae* et *Festuca rubra*, *E. amarillans* et *Agrostis hiemalis*.

- Type III mutualiste : le champignon endophyte croît dans l'ovule en développement au sein d'une inflorescence et « infecte » les semences. Tout au long du développement de la plante, le mycélium est sous une forme strictement endophyte, sa reproduction est asexuée. Ce type de d'interaction se retrouve pour *Neotyphodium coenophialum* et *Lolium arundinaceum*, *N. lolii* et *Lolium perenne*.



Plante infectée	Espèce	Référence	Plante infectée	Espèce	Référence
1-a,b Festuca arizonica	N. starrii	[47,145]	6-d Bromus inermis	N. spp	[24]
1-c Achnatherum robustum	N. sp	[48]	6-e Bromus magnus	N. spp	[24]
2-a Bromus setifolius	N. tembladerae	[172]	6-f Deschampsia caepitosa	N. spp	[24]
2-b Festuca argentina	N. sp	[10]	6-g Elymus cylindricus	N. spp	[24]
2-c Festuca hieronymi	N. sp	[10]	6-h Elymus dahuricus	N. spp	[24]
3-a Agrostis capillaris	N. spp	[135]	6-i Elymus nutans	N. spp	[24]
3-b Alopecurus pratensis	N. spp	[135]	6-j Elymus tangutorum	N. spp	[24]
3-c Calamagrostis epigejos	N. spp	[135]	6-k Elytrigia dahuricus	N. spp	[24]
3-d Calamagrostis lapponica	N. spp	[135]	6-l Festuca alata	N. spp	[24]
3-e Dactylis glomerata	N. spp	[135]	6-m Festuca modesta	N. spp	[24]
3-f Deschampsia flexuosa	N. spp	[135]	6-n Festuca rubra	N. spp	[24]
3-g Deschampsia cespitosa	N. spp	[135]	6-o Festuca sinensis	N. spp	[24]
3-h Elymus repens	N. spp	[135]	6-p Hordeum bogdanii	N. spp	[24]
3-i Festuca ovina	N. spp	[135]	6-q Hordeum violaceum	N. spp	[24]
3-j Festuca pratensis	N. spp	[135]	6-r Leymus chinensis	N. spp	[24]
3-k Festuca rubra	N. spp	[135]	6-s Poa alpina	N. spp	[24]
3-l Lolium arundinaceum	N. coenophialum	[135]	6-t Poa pratensis	N. spp	[24]
3-m Phalaris arundinacea	N. spp	[135]	6-u Poa tibetan	N. spp	[24]
3-n Phleum pratense	N. spp	[135]	6-v Bromus tomentellus	N. spp	[101]
3-o Lolium spp.	N. spp	[85]	7-a Echinopogon ovatus	N. spp	[100]
4-a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, n Lolium spp.	N. spp	[85,87]	7-b E. phleoides	N. spp	[100]
4-o, p Lolium arundinaceum	N. coenophialum	[32]	7-c E. nutans var. major	N. spp	[100]
4-m Festuca eskia	N. sp	[61]	7-d E. nutans var. nutans	N. spp	[100]
4-q Festuca ovina	N. spp	[24]	7-e E. mckiei	N. spp	[100]
5-a, b Lolium arundinaceum	N. coenophialum	[32]	7-f E. intermedius	N. spp	[100]
6-a Triticum spp	N. spp	[94]	7-g E. caepitosus	N. spp	[100]
6-b Achnatherum inebrians	N. ganguense	[24]	7-h E. cheelii	N. spp	[100]
6-c Agropyron cristatum	N. spp	[24]	7-i E. ovatus	N. spp	[100]

FIGURE 1 : Répartition des populations de graminées endophytées dans le monde (1 : Amérique du Nord, 2 : Amérique du Sud, 3 : Europe du Nord, 4 : Europe centrale et du Sud, 5 : Afrique du Nord, 6 : Asie, 7 : Australie)

Certaines de ces associations peuvent conduire à la synthèse de mycotoxines [78]. La production dans la plante hôte est sous l'influence de différents facteurs tels le génotype de la graminée, le type d'association hôte- endophyte et des facteurs externes tels le pédoclimat, les apports minéraux ou encore hydriques [6].

Le genre *Neotyphodium* est particulièrement étudié car la symbiose joue un rôle dans la survie et la persistance des graminées infectées mais est aussi à l'origine de la production de mycotoxines responsables d'effets toxiques sur les animaux [24].

LE GENRE *NEOTYPHODIUM*

Les champignons endophytes du genre *Neotyphodium*, anciennement *Acremonium* [60], désignent la forme anamorphe (asexuée) des champignons du genre *Epichloë* [77]. La spécificité vis-à-vis de leur hôte est forte ; les *Neotyphodium* ne sont associés qu'à une seule sous-famille de *Poaceae* : les *Pooideae* [144].

Diversité et répartition géographique

Cinquante-cinq espèces du genre *Neotyphodium* ont été génétiquement identifiées et 23 ont été décrites sur différents végétaux se développant sur tous les continents [144] (figure 1). La fréquence des *Neotyphodium* dans les populations végétales testées est très hétérogène. En Amérique et en Afrique du Nord les populations de graminées naturelles semblent très fortement endophytées (70 à 100%) mais peu de populations et d'associations ont été testées (Figure 1). En Europe centrale et du Sud, en Asie, les taux d'endophytisme sont intermédiaires (55 à 61%) alors qu'en Europe du Nord et en Océanie il y a le moins de 35% de graminées naturellement endophytées.

Croissance et cycle de vie

Les *Neotyphodium* se reproduisent de manière strictement asexuée (figure 2), par transmission verticale. L'hyphe se développe dans l'épi, dans les méristèmes floraux, puis dans les ovules [157]. Il pénètre ensuite dans l'embryon [171] et infecte une nouvelle génération de graines. Ces champignons sont transmis via les semences, de la plante mère à la plante fille, mais ils ne peuvent pas être transportés par le pollen [147]. Ce type de reproduction limite le brassage génétique et la contamination de plante non endophytée mais assure un fort taux d'endophytisme dans les zones infestées, puisqu'une plante hôte peut avoir 100% de ses graines colonisées [29]. Le faible taux de contamination retrouvé en Europe du Nord et en Océanie pourrait s'expliquer par la migration de plantes non endophytées provenant de populations exogènes et/ou une transmission imparfaite du champignon [122].

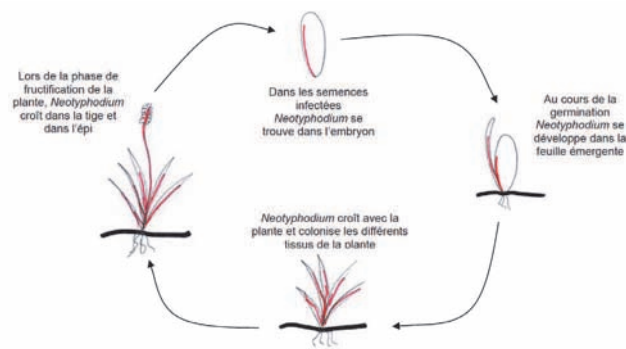
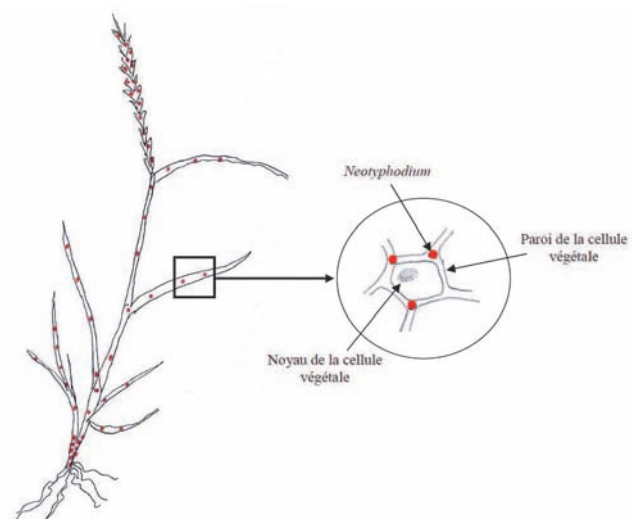


FIGURE 2 : Représentation schématique du cycle de vie des champignons endophytes du genre *Neotyphodium* (—).

Bien que *Neotyphodium* colonise l'espace intercellulaire (apoplasme) de toutes les parties de la graminée [170], un gradient de concentration croissant de la base vers la région apicale a été mis en évidence (figure 3) [64]. L'hyphe est beaucoup plus ramifiée au niveau des méristèmes de la partie basale ou inférieure, que dans les feuilles en croissance ou matures [25]. Il est essentiellement disposé le long de l'axe longitudinal des cellules adjacentes et plus abondant autour des cellules du mésophylle [25]. La croissance des *Neotyphodium* dépend de celle de la graminée : il croît avec la feuille et cesse son extension et sa ramification quand la pousse est terminée [25, 64, 160]. L'origine de cette synchronisation semble liée à la production d'espèces réactives de l'oxygène par une NADPH oxydase mycélienne [162]. L'activité métabolique du champignon est conservée alors que sa croissance et celle de la plante sont achevées [160].



FFIGURE 3 : Répartition de *Neotyphodium* (●) dans la plante hôte et détail des espaces intercellulaires d'une section de feuille

Avantages et inconvénients de la symbiose pour le champignon

La plante protège le champignon des environnements extérieurs et intérieurs [78]. L'espace intercellulaire est une niche dans laquelle il existe peu de concurrence avec d'autres microorganismes, et une source de nutriments : glucides, acides organiques, composés azotés, ions inorganiques. [78, 141]. L'hyphe est en contact étroit avec la cellule végétale mais ne semble pas développer de structures d'alimentations particulières [25, 141], ce qui suggère des mécanismes actifs d'absorption des nutriments. *Neotyphodium typhinum* exprime une protéinase (At1) similaire aux enzymes protéolytiques produites par des moisissures pathogènes [125]. Il possède également des invertases permettant l'absorption du saccharose apoplastique via un mécanisme actif [79]. Ces composés organiques permettent aussi de réguler l'activité biologique des *Neotyphodium* et de contribuer à la diversité des métabolites secondaires produits (mycotoxines) [78].

IMPACT DE L'ENDOPHYTE SUR LE DÉVELOPPEMENT VÉGÉTAL

Les *Neotyphodium* produisent des hormones végétales, des glycosidases, et des protéases [79, 177] qui modifient les voies métaboliques de la plante telles la photosynthèse, la conductance stomatique et l'ajustement osmotique [42, 102-103, 109]. L'impact de l'endophytisme sur le développement végétal semble toutefois différent selon la présence ou l'absence de facteurs de stress.

En l'absence de stress

En l'absence de stress, l'influence des *Neotyphodium* sur la croissance de la plante hôte est controversée. De nombreuses études menées sous des conditions de croissance contrôlées montrent des résultats contradictoires. Ces résultats sont présentés selon qu'ils concernent la croissance végétale et la reproduction ou le mécanisme photosynthétique.

Croissance végétale et reproduction

Les principales observations réalisées sur des plantes endophytées par *N. coenophialum* et *N. lolii* décrivent une augmentation de la surface foliaire [81], du nombre de talles [21, 81], des poids secs des racines et des pousses [21, 81], une meilleure accumulation de la masse sèche [27] et une meilleure repousse après la fauche [24] par rapport aux témoins non endophytés. Des études confirment certaines de ces observations avec d'autres *Neotyphodium* [24, 166] alors que d'autres les contredisent [73, 155]. Ces résultats hétérogènes peuvent s'expliquer par le fait que lorsque les conditions environnementales sont moins favorables les coûts potentiels de l'infection peuvent parfois l'emporter sur les avantages retirés par la plante [23].

En ce qui concerne la reproduction, les résultats obtenus sont plus homogènes. Les différentes études effectuées (*N. coenophialum* et *N. lolii* respectivement en symbiose avec de la fétuque élevée et du ray grass anglais) montrent une amélioration de la production des graines et de leur germination pour les plantes endophytées [24, 27, 65].

Métabolisme photosynthétique

La présence de l'endophyte favorise le déroulement de la photosynthèse chez la graminée mais seulement sous certaines conditions environnementales. Le rendement photosynthétique peut être amélioré chez des graminées endophytées (*L. arundinaceum*, *L. perenne*, *F. arizonica*) par rapport aux témoins lorsque : la température foliaire augmente [93], l'éclairage et les taux en CO₂ atmosphérique sont élevés [102], l'apport hydrique est faible [102-103], les apports en azote sont importants [109] ou lorsque la quantité en zinc du sol est réduite [102]. Peu d'études ont été menées sur l'impact du champignon sur la plante hôte en milieux non contrôlés, en particulier avec des graminées autochtones. C'est pourquoi la corrélation directe entre le rendement photosynthétique (ou d'autres variables physiologiques du mécanisme de photosynthèse) et la survie, la croissance ou la capacité de reproduction des graminées endophytées reste inconnue.

En présence de stress

L'effet de l'endophyte dépend en grande partie du génotype de l'hôte [24]. L'influence de la sécheresse et du taux de fertilisation sur la croissance végétale ont principalement été étudiés sur fétuque élevée et ray-grass anglais endophytés.

Sécheresse

Les parcelles de fétuque élevée endophytée par *N. coenophialum* présentent une biomasse, une densité, une taille des talles ainsi qu'un rendement en masse sèche plus élevés que les témoins non endophytés [1, 24]. La tolérance à la sécheresse est liée à la diminution de la conductance stomatique, découlant elle-même d'une baisse de transpiration foliaire, d'une meilleure utilisation de l'eau et d'une amélioration de l'ajustement osmotique [42, 92]. Cet ajustement améliorerait la capacité de la plante à accumuler des métabolites (glucides et acides aminés fabriqués par la graminée, alcaloïdes produits par l'endophyte) et ainsi à maintenir la turgescence des cellules pendant la sécheresse [24, 92]. Ces résultats sont contredits par d'autres études qui ne mettent pas en évidence de différence entre plantes endophytées et non endophytées sur ces mêmes paramètres dans d'autres conditions agronomiques [24, 67]. Ces résultats contradictoires sont encore plus marqués avec d'autres associations (*F. eliator* - *N. uncinatum*, *F. arizonica* - *N. starrii*, *L. pratense* - *N. uncinatum* et *L. perenne* - *N. lolii*) [85, 103, 121, 123].

Ainsi, les effets des champignons endophytes du genre *Neotyphodium* sur l'utilisation de l'eau et sur des marqueurs physiologiques de la tolérance à la sécheresse de la plante hôte ne sont pas clairement démontrés dans toutes les circonstances.

Fertilisation minérale du sol

Certaines études ont mis en évidence une augmentation des capacités d'adaptation des plantes endophytées face à un stress minéral (principalement en azote et phosphore) dans le sol : augmentation du prélèvement et de l'accumulation des minéraux dans la plante, augmentation des surfaces racinaires, augmentation de la croissance de la plante... [86, 89, 91-92, 121]. A l'inverse, une absence d'effet de *Neotyphodium* a été observée sur différents paramètres de croissance de la plante (biomasse, nombre de pousses et de tiges, etc) [23-24].

Les bénéfices apportés par *Neotyphodium* à la plante hôte semblent plus évidents dans un environnement riche en nutriments [1, 137]. Bien que l'association graminée-endophyte puisse représenter une «symbiose adaptative» par rapport à certains stress environnementaux, comme cela est le cas pour d'autres systèmes plante- champignon [127], il n'est actuellement pas possible de conclure avec certitude que les endophytes confèrent une plus grande tolérance aux plantes hôtes dans les écosystèmes naturels. Cependant, les fortes prévalences observées en milieux stressants le laisse fortement supposer [85].

Autres stress

Différentes études ont été menées sur l'impact de l'endophytisme lors de contamination du sol par de l'aluminium [92] ou du zinc [102], sous différents pH du sol [8, 22, 92], différents teneurs en CO₂ [69, 109], ou lors d'exposition aux rayonnements UV [110] et à des températures élevées [40, 46] (tableau 2). Ces études montrent que la capacité du champignon à protéger la plante aux différents stress est variable. Ainsi des niveaux de radiation UV élevés entraînent une diminution du nombre d'inflorescences et de graines de ray-grass anglais endophytés par rapport à des plantes non infectées [110]. Des fétuques élevées endophytées exposées à des pluies acides (pH 3, 4.5 et 6) ont une masse sèche équivalente ou meilleure que des plantes non endophytées [22]. Une concentration atmosphérique élevée de CO₂ n'entraîne aucune modification physiologique ou morphologique chez des fétuques élevées et des ray-grass anglais endophytés [69, 109].

Compétition entre plantes

Les graminées endophytées croissent dans des zones colonisées par d'autres espèces végétales. Des compétitions intra et/ou interspécifique se développent pour que chaque individu puisse accéder aux ressources naturelles. La capacité d'une plante à être plus compétitive que les autres dépendra de sa rapidité de croissance, sa taille et sa capacité de reproduction [24].

Les études effectuées concernent principalement des variétés agronomiques endophytées de fétuque élevée et de ray grass anglais. Sur prairies, une étude a mis en évidence

Facteur	Couple plante/endophyte	Effets	Référence
Teneurs en CO ₂ atmosphérique élevées	<i>L. arundinaceum</i> / <i>N. coenophialum</i>	↗ / →	[69, 109]
Températures élevées	<i>L. perenne</i> / <i>N. lolii</i>	→	[40]
Niveaux élevés de radiation UV	<i>L. perenne</i> / <i>N. lolii</i>	↘	[110]
Pluies acides	<i>L. arundinaceum</i> / <i>N. coenophialum</i>	↘	[22]
pH du sol	<i>L. arundinaceum</i> / <i>N. coenophialum</i>	↗ / ↘	[8, 92]
Contamination du sol : Aluminium	<i>L. arundinaceum</i> / <i>N. coenophialum</i>	→	[92]
Zinc	<i>L. perenne</i> / <i>N. lolii</i>	↗ / →	[102]

Par rapport à une graminée non endophytée :

↗ : Amélioration de la croissance

→ : Aucune influence

↘ : Croissance plus faible

TABLEAU II : Influence de *Neotyphodium* sur la croissance d'une graminée soumise à différentes conditions de stress

LES *NEOTYPHODIUM* : GÉNÉRALITÉS ET CONTEXTE FRANÇAIS.

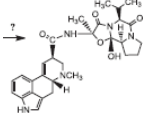
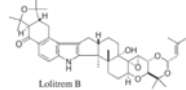

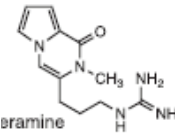
une meilleure capacité de compétition interspécifique pour des plantes endophytes [52]. *Neotyphodium coenophialum* améliorerait la capacité d'installation et de pérennité de la fétuque élevée en conditions expérimentales [24, 31]. D'autres études en compétition interspécifique sous serre ne montrent pas d'effet significatif ou des effets variables [68, 90] voire même des effets négatifs de l'endophytisme [24].

Les mycotoxines produites par les champignons du genre *Neotyphodium*

A la fin du XIX^{ème} et début du XX^{ème} siècles, plusieurs cas d'intoxications (narcose, tremblements...) de bétail (équins, ovins, bovins) ont été répertoriés sur plusieurs continents (Amérique, Asie, Europe, Océanie) suite à la consommation

de graminées fourragères indigènes (*Achnatherum robustum* « Herbe endormie », *Achnatherum inebrians* « Herbe du cheval ivre », *Festuca hieronymi* « La tremblante » *Melica descumbens* « Herbe ivre ») [45]. Différentes études ont permis dans les années 1980-1990 de relier ces toxicoses à des alcaloïdes [e.g. 53] produits par des champignons du genre *Neotyphodium* [e.g. 11].

Cette deuxième partie a pour objectif de présenter la diversité des mycotoxines produites par *Neotyphodium*, leurs voies de biosynthèse, les différents facteurs de régulation de ces voies, la distribution de ces molécules dans la plante, les rôles écologiques et enfin les méthodes de dosage de ces mycotoxines.

Alcaloïdes		Effets biologiques		<i>Neotyphodium</i> producteurs	Référence
Groupe	Molécule étudiée	Symptômes	Dose (mg/kg)		
Alcaloïdes de l'ergot	Ergovaline 	« Fescue toxicosis » (bétail) : Vasoconstriction Hyperthermie Baisse production lait Perte de poids	0,5 - 0,8 (I)	N. coenophialum N. lolii N. gansuense N. gansuense var. inebrians N. starrii N. sp. Lp1	[41, 113, 144, 148, 163, 164]
	Egotamine	Mort (lapin)	DL ₅₀ =3 (IV)		
	Acide lysergique	Mort (lapin)	DL ₅₀ =100 (IV)		
	Ergonovine	Mort (lapin)	DL ₅₀ =3,2 (IV)		
Indole-diterpènes	Lolitrème B 	« Ray grass staggers » (bétail) : Tremblements Tremblements (souris)	1,8 - 2 (I) +++ à 2 (IP)	N. autsraliense N. gansuense var. inebrians N. lolii N. sp. Lp1	[54, 100, 106-107, 113, 133, 164] [54]
	Lolitrème F	Tremblements (souris)	++ à 4 (IP)		
	Lolitrème A	Tremblements (souris)	++ à 2 (IP)		
	Paxilline	Tremblements (souris)	++ à 8 (IP)		
	Terpendole C	Tremblements (souris)	+++ à 8 (IP)		
Lolines	N-formylloline 	Mort (puceron vert)	CL ₅₀ =343 (µg/ml)	N. aotearoae N. coenophialum N. occultans N. pampeanum N. siegelii N. uncinatum	[29, 70, 126, 143, 152]
	N-acétylloline	Mort (puceron vert)	CL ₅₀ =437 (µg/ml)		
	N-méthylloline	Mort (puceron vert)	CL ₅₀ =361 (µg/ml)		
Péramine	Péramine 	Effet répulsif (insectes)	1 - 10 (I)	N. coenophialum N. herfanum N. lolii N. scharldii N. siegelii N. starrii N. tembladerae N. typhinum var. canariense	[29, 75, 144, 148]

DL₅₀: dose létale 50

CL₅₀: concentration létale 50

I : ingestion ; IV : intraveineuse ; IP : intrapéritonéale

++ : Pas de tremblement au repos, l'exercice ou la manipulation provoque des nombreux tremblements de durée et d'intensité modérées.

+++ : Au repos, tremblements spontanés de faible intensité. L'exercice ou la manipulation provoque des tremblements répétés d'intensité modérée à sévère.

TABLEAU III : Exemples de mycotoxines produites par des *Neotyphodium* et de leurs effets biologiques

DIVERSITÉ DES MYCOTOXINES PRODUITES PAR LES *NEOTYPHODIUM*

Au moins 50% des *Neotyphodium* peuvent produire des mycotoxines appartenant à quatre groupes d'alcaloïdes : le groupe des alcaloïdes de l'ergot (AE), le groupe des indole-diterpènes (ID), le groupe des 1-aminopyrrolizidines ou lolines (L) et le groupe des pyrrolopyrazines ou péramine (P). La synthèse de ces alcaloïdes par les *Neotyphodium* varie d'une espèce à l'autre, mais aucun *Neotyphodium* ne semble capable de produire les 4 classes d'alcaloïdes [78]. Le tableau 3 illustre les molécules les plus étudiées, leurs effets biologiques et certaines espèces fongiques productrices. L'ergovaline et le lolitrème B sont de grosses molécules possédant des acides aminés à cycle aromatique. Leurs effets biologiques concernent principalement les mammifères herbivores. A l'inverse, les lolines et la péramine sont de petites molécules hétérocycliques composées d'acides aminés aliphatiques qui sont surtout toxiques pour les insectes et nématodes herbivores.

Le groupe des alcaloïdes de l'ergot (AE)

Les alcaloïdes de l'ergot (AE) regroupent 3 types structuraux différents : les clavines, les dérivés amides de l'acide D- lysergique (ergoamides) et les dérivés peptidiques de cet acide (ergopeptines) [142]. Les alcaloïdes les plus fréquemment synthétisés par les *Neotyphodium* sont les ergopeptines. Elles peuvent représenter jusqu'à 50% des alcaloïdes totaux du groupe des AE dans la fétuque élevée associée à *Neotyphodium coenophialum* [88]. L'ergovaline est la principale ergopeptine produite [144]. Elle est même l'alcaloïde majeur de ce groupe dans la fétuque élevée (*Lolium arundinaceum*), le ray grass anglais (*Lolium perenne*) et l'*Hordeum spp.* endophytés [88, 148, 163].

Les AE peuvent interagir avec le système nerveux central. Leurs effets sont liés à la similarité de structure avec la noradrénaline, la dopamine et la sérotonine. Ils agissent alors comme agonistes ou antagonistes de ces neurotransmetteurs. Leurs différences physico-chimiques et pharmacologiques dépendent des substituants greffés au groupement carbonyle de l'acide D- lysergique. Les ergopeptines étant considérées comme alcaloïdes majeurs du groupe des AE, elles seraient principalement responsables des symptômes de « fescue toxicosis » chez les animaux consommant de la fétuque élevée [80]. Cependant d'autres alcaloïdes de ce groupe peuvent avoir des effets aussi voire plus importants que les ergopeptines [41].

Le groupe des indole- diterpènes (ID)

Les *Neotyphodium* peuvent synthétiser des indole-diterpènes (ID) du groupe de la paxilline dont on différencie 9 types structuraux [133] : les pénitrèmes, les janthitrèmes, les lolitrèmes, l'affatrème, la paxilline, les paspalines/paspalinines/paspalitrèmes), les terpendoles, les shearinines

et les sulpinines. Un grand nombre de ces mycotoxines est potentiellement trémorgène chez les mammifères et toxique chez les insectes. Elles jouent un rôle dans la modulation des différents canaux ioniques [149].

La majorité des études concernant les ID a été conduite sur le ray grass anglais en symbiose avec *N. lolii* [56, 99, 105-107, 176]. Il a été mis en évidence dans cette graminée endophytée que le lolitrème B est le lolitrème le plus abondant (le lolitrème B et le lolitrème F représentent 77%) et que les lolitrèmes E et A représentent respectivement 15 et 8% des lolitrèmes totaux [105].

Dans les années 1980, deux études mettent en évidence l'implication des lolitrèmes dans les problèmes de désordres neuromusculaires (appelés « ryegrass staggers ») d'animaux pâturant du ray grass anglais endophyté (*N. lolii*) [53]. Plusieurs études ont par la suite souligné des différences de toxicité entre les lolitrèmes. Les lolitrèmes A, B et F sont considérés comme les indole- diterpènes les plus trémorgènes [99, 105-107]. Même si d'autres ID (paxilline, terpendole C) ont une activité trémorgène, elle est considérée comme inférieure à celle des lolitrèmes [56].

Le groupe des 1-aminopyrrolizidines ou lolines

Les mycotoxines du groupe des 1-aminopyrrolizidines ou lolines peuvent être synthétisées par les *Neotyphodium*. Sept molécules ont été identifiées : norloline, loline, N-acétylloline, N-formylloline, N-méthylloline, N-formylnorloline, N-acétylnorloline [11, 143]. La N-formylloline (NFL) et la N-acétylloline (NAL) sont les deux lolines les plus fréquemment retrouvées dans les graminées endophytées [143, 163]. Jusqu'à 79% des plantes testées peuvent contenir de la NFL [143]. En quantité, elles sont également les 2 lolines les plus synthétisées dépassant les 17000 mg/kg de matière sèche pour la NFL [72, 163]. La NFL et la NAL peuvent représenter jusqu'à 90% (respectivement 60 et 30%) de la quantité totale de lolines produites dans la plante hôte [72].

Ces mycotoxines peuvent exercer une action nématocide [24] et insecticide comparable à celle de la nicotine [126].

Le groupe des pyrrolopyrazines

La péramine est l'unique mycotoxine du groupe des pyrrolopyrazines. Elle est uniquement synthétisée par les champignons endophytes du genre *Epichloë / Neotyphodium* en association avec des graminées [29]. La péramine est l'alcaloïde le plus fréquemment retrouvé dans les plantes hôtes endophytées, suivi des mycotoxines du groupe des alcaloïdes de l'ergot, puis des lolines et enfin des indole-diterpènes [148]. Cette molécule possède des propriétés toxiques et répulsives contre de nombreuses espèces d'insectes [78].

VOIES DE BIOSYNTHÈSE

Quatre voies de synthèse distinctes ont été mises en

LES *NEOTYPHODIUM* : GÉNÉRALITÉS ET CONTEXTE FRANÇAIS.

évidence pour les 4 classes d'alcaloïdes.

Le groupe des alcaloïdes de l'ergot (AE)

La première étape est commune à la biosynthèse de tous les AE produits par les *Neotyphodium*. Elle permet la formation de diméthylallyltryptophane (DMATrp), premier précurseur des clavines, des ergoamides et des ergopeptines (figure 4). Les clavines sont synthétisées en début de chaîne à partir de la chanoclavine I et de la chanoclavine aldéhyde [113]. Les ergoamides et les ergopeptines sont synthétisées à partir de l'acide D- lysergique [112, 144].

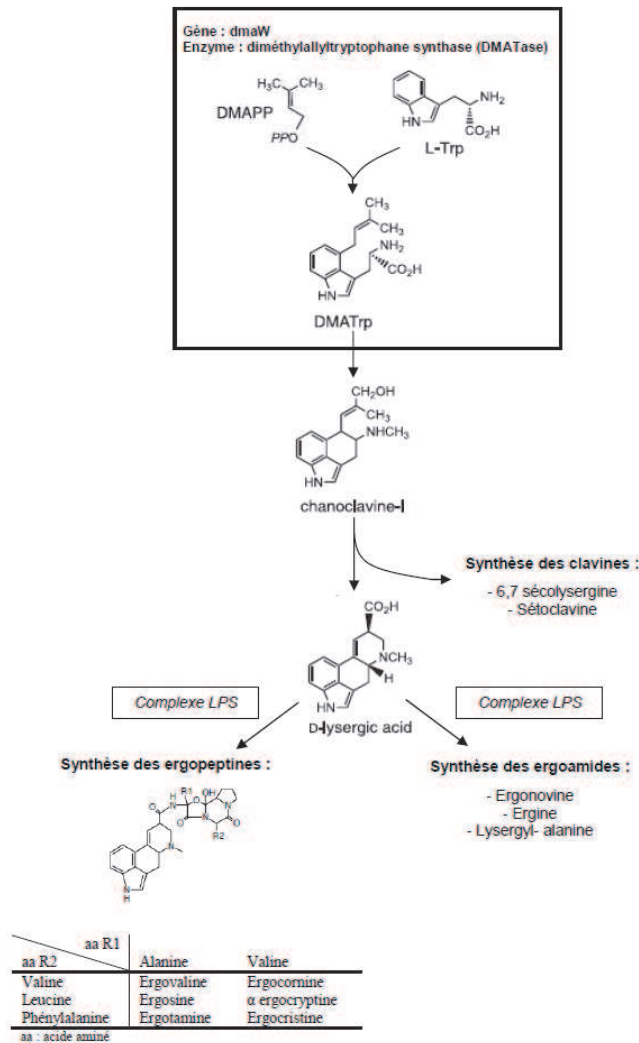


FIGURE 4 : Schéma simplifié de la voie de biosynthèse des mycotoxines appartenant aux alcaloïdes de l'ergot chez les *Neotyphodium*

Les ergopeptines sont des peptides non ribosomiques contenant de l'acide D- lysergique et 3 acides aminés (non polaires) qui varient d'une ergopeptine à l'autre (figure 4). Par exemple l'ergovaline contient de la L-alanine, de la L-valine et de la L-proline alors que l'ergotamine contient de la L-phénylalanine à la place de la L-valine [142]. Leur synthèse est catalysée par un complexe enzymatique multifonctionnel de synthèse des peptides non ribosomiques appelé lysergyl peptide synthétase (LPS) [169]. La LPS est constituée de

2 sous unités distinctes : la lysergyl peptide synthétase 1 (LPS1, 370kDa) codée par les gènes *lpsA1* et *lpsA2* et la lysergyl peptide synthétase 2 (LPS2, 140KDa) codée par le gène *lpsB* [112, 142, 144]. La LPS2 active l'acide lysergique par une adénylation puis le transfère au LPS1. Cette sous unité reconnaît et active les 3 acides aminés puis assemble le peptide lysergique à partir des différents composés activés [112, 169]. Une cyclisation spontanée du produit obtenu permet de former l'ergopeptine finale [112].

La synthèse des AE requiert l'activation de nombreux gènes du cluster *EAS* [142]. Par exemple, pour produire de l'ergovaline, 12 gènes de ce cluster doivent être activés [144]. L'intensité de la synthèse est contrôlée génétiquement [112]. Par exemple, une accumulation d'acide lysergique entraîne un rétrocontrôle sur la production et/ou les activités enzymatiques des réactions intermédiaires [112]. Il existe également plusieurs facteurs limitant la biosynthèse de ces alcaloïdes comme la disponibilité en tryptophane et en calcium, coenzyme de la DMATase [131].

Le groupe des indole- diterpènes (ID)

Comme pour le groupe des AE, l'étape commune à la biosynthèse des ID utilise un noyau indole (e.g. tryptophane) qui est incorporé à du géranylgeranylpyrophosphate (figure 5) [133]. Les différentes réactions de cette première étape nécessitent l'activation d'au moins 4 gènes (*ltmG*, *ltmM*, *ltmC*, *ltmB*) du locus *LTM* [133, 144]. Elles permettent la synthèse du précurseur commun aux ID : la paspaline [144, 176]. Les terpendoles sont produits à partir de cette molécule et permettent eux-mêmes la formation des lolitrèmes via les gènes *ltmE*, *ltmJ*, *ltmF* et *ltmK* (figure 5) [174].

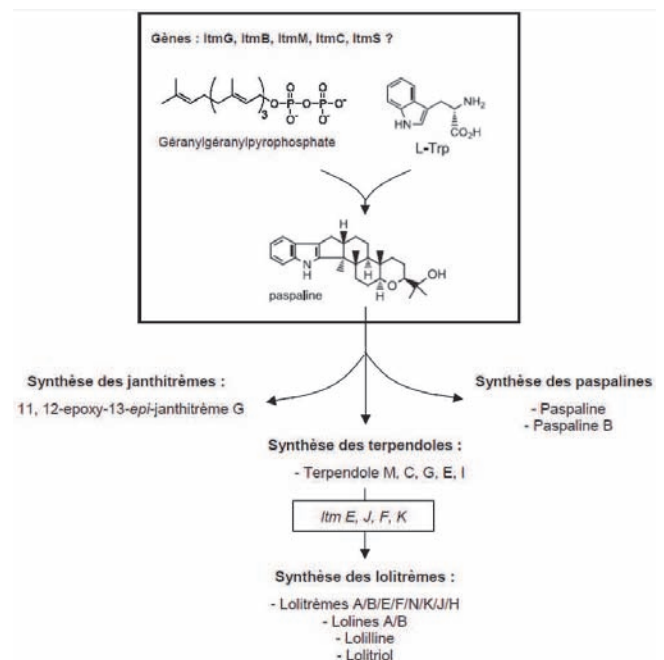


FIGURE 5 : Schéma simplifié de la voie de biosynthèse des indole- diterpènes chez les *Neotyphodium*

La biosynthèse des ID implique l'activation de 3 clusters de gènes : le cluster 1 avec les gènes *ltmG*, *ltmM* et *ltmK* [174], le cluster 2 avec les gènes *ltmB*, *ltmC*, *ltmF*, *ltmQ* et *ltmP* et le cluster 3 avec les gènes *ltmJ* et *ltmE* [175]. Ces 10 gènes codent pour différents types d'enzymes : des transférases (*ltmC*, *ltmE*, *ltmF*), une synthase (*ltmG*) et des oxygénases (*ltmJ*, *ltmK*, *ltmM*, *ltmP*, *ltmQ*) [133].

L'expression du gène *ltmM* varierait en fonction des différentes échelles spatio-temporelles lors de la phase reproductrice de la plante hôte [95]. Ce gène est fortement exprimé dans l'épillet pendant la phase pré-anthèse puis dans le gynécée (pistil) après la fécondation ainsi que pendant la germination [95].

Les lolines

Les lolines proviennent de l'assemblage de 2 acides aminés : la proline et l'homosérine, obtenue à partir de l'acide aspartique (figure 6) [178]. Cette première étape permet de former du *N*-(3-amino, 3-carboxy)propyl-L-proline (NACPP) par une réaction de condensation liant le noyau homosérine de l'*O*-acétyl-L-homosérine (OAH) et la proline [12]. Cette réaction est catalysée par une enzyme de type γ -PLP (γ -pyridoxal phosphate) codée par le gène *lolC* du locus *LOL* [143, Wilkinson et al., 2000]. La succession d'au moins 5 réactions biochimiques nécessitant l'activation de 5 gènes (*lolE*, *lolD*, *lolT*, *lolO* et *lolE*) permet la synthèse de la première loline [178] : la *N*-acétylnorloline (NANL). La transformation de la NANL en norloline (NL) est catalysée par une acétamidase codée par le gène *lolN* [143-144, 154]. La synthèse de la loline et celle de la *N*-méthylloline (NML), respectivement à partir de la NL et de la loline, sont activées par à une méthyltransférase commune codée par le gène *lolM* [143-144, 154]. La formation de *N*-acétylloline (NAL) à partir de la loline est catalysée par une acétyltransférase. Enfin la NML est transformée en *N*-formylloline (NFL) grâce à une cytochrome P450 monooxygénase codée par le gène *lolP* [143-144, 154].

Il a été mis en évidence que la concentration en lolines produites était proportionnelle à l'expression du gène *lolC* [158]. Certains gènes interviendraient dans la régulation de l'expression génétique. Le gène *lolU* du cluster *LOL* coderait pour une protéine de régulation de la voie de biosynthèse [154]. Le gène *lolA* serait impliqué pour limiter la production de lolines [179].

La péramine

C'est la seule mycotoxine appartenant groupe des pyrrolopyrazines. Une voie hypothétique de synthèse est donné dans la figure 7 [161].

Un gène, *PerA*, est nécessaire et suffisant pour assurer la synthèse de cette molécule [161]. Comme pour les ergopeptines (groupe des AE), ce gène code pour la formation d'un complexe enzymatique NRPS [161]. Il est

composé de deux modules ayant chacun plusieurs domaines enzymatiques. Le premier module possède deux domaines : un pour une adénylation et l'autre pour une thiolation [161]. Le deuxième contient une zone de condensation, une d'adénylation, une de thiolation ainsi qu'une zone de réduction [161].

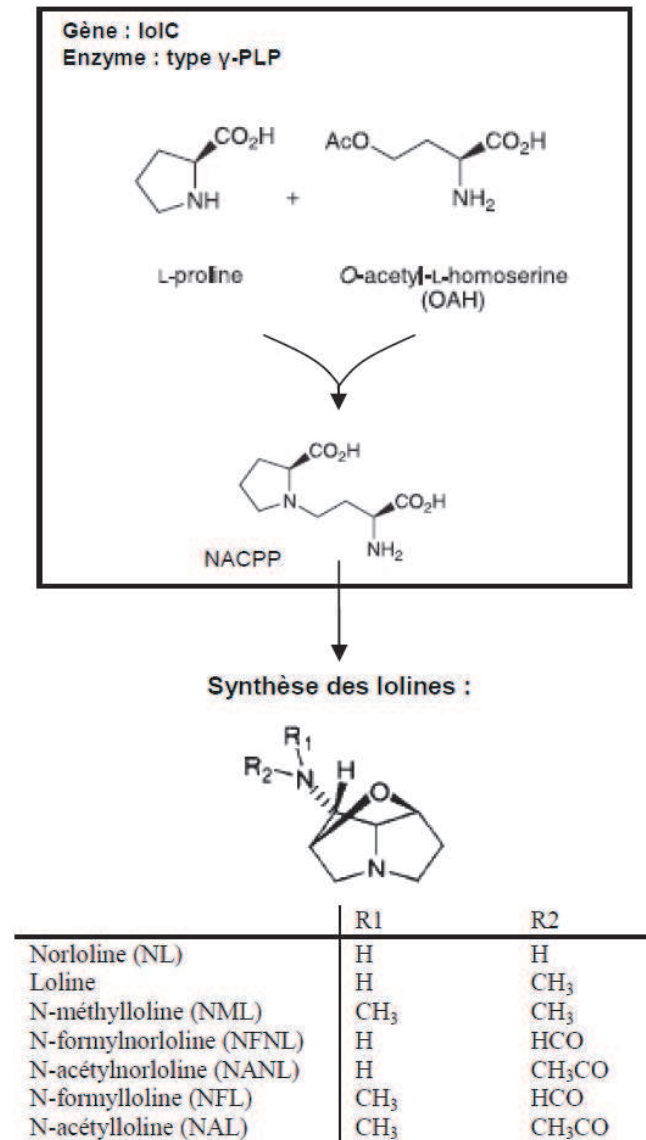


FIGURE 6 : Schéma simplifié de la voie de biosynthèse des lolines chez les *Neotyphodium*

DISTRIBUTION DES MYCOTOXINES DANS LA PLANTE

La répartition des principales mycotoxines dans la plante hôte est schématisée dans la figure 8. Même si ces composés sont mobilisables dans la sève, leur accumulation dépend du génotype de la plante et du type de tissu [75, 153]. Ces différences seraient liées aux taux de biosynthèse, de dégradation et/ou de translocation des mycotoxines [153]. Le lolitrème B serait retenu dans l'hyphe du champignon, l'ergovaline serait associée à la croissance du champignon dans des tissus spécifiques et la péramine serait « transloquée »

LES *NEOTYPHODIUM* : GÉNÉRALITÉS ET CONTEXTE FRANÇAIS.

dans l'espace intercellulaire de la plante et par conséquent mobilisée et/ou métabolisée par la graminée [75].

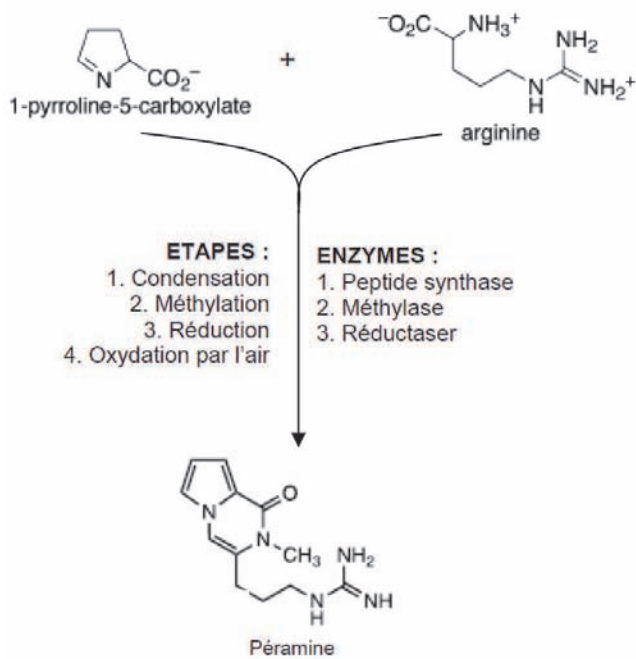


FIGURE 7 : Schéma simplifié de la voie de biosynthèse de la péramine chez les *Neotyphodium*

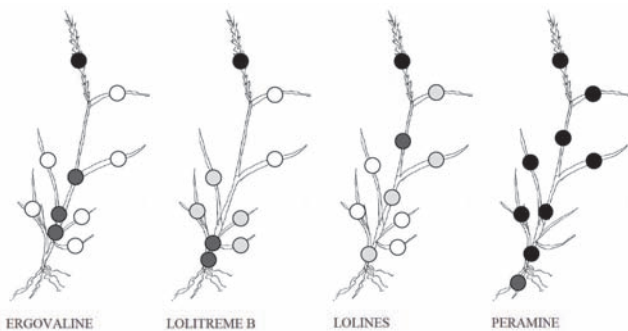


FIGURE 8 : Représentation schématique de la répartition des teneurs (• > ◦ > ◦ > ◦) en ergovaline, lolitrème B, lolines et péramine dans la plante-hôte

L'ergovaline (groupe des alcaloïdes de l'ergot)

Le limbe des feuilles du ray grass anglais (*N. lolii*) et de la fétuque élevée (*N. coenophialum*) est la partie contenant le moins d'ergovaline [88, 153]. Dans les parties végétatives, cette molécule se concentre dans la tige et la gaine foliaire des feuilles d'âge intermédiaire [153]. Les teneurs les plus élevées mesurées dans la base des tiges se situent entre 0,4 et 3 mg/kg MS [142]. Les graines de fétuque élevée contiennent les concentrations les plus élevées en ergovaline qui peuvent atteindre 8 mg/kg MS [131].

Le lolitrème B (groupe des indole- diterpènes)

Les tissus les plus jeunes ont les teneurs les plus basses en lolitrème B (moins de 1 mg/kg MS) [74, 153]. Cette

mycotoxine est également retrouvée en quantité non négligeable dans le limbe des feuilles du ray grass anglais [5, 74]. Les concentrations les plus élevées en lolitrème B des parties végétatives de la plante se trouvent dans les tissus les plus âgés et sénescents, proche du talle (jusqu'à 6 mg lolitrème B/kg MS) [5, 74, 153]. Des quantités très importantes sont retrouvées dans les graines, elles peuvent représenter jusqu'à 60% de la quantité totale en lolitrème B [5].

Les lolines

Les lolines sont réparties de manière croissante entre la base et la partie apicale de la plante [72]. Les parties végétatives contiennent moins de 40% de la quantité totale de lolines [72]. Les teneurs sont réparties selon un gradient de concentration croissant à partir des organes les plus âgées vers les plus jeunes [72]. Dans la partie végétative, quelque soit son âge, la tige contient plus de 70% des lolines [72]. La partie reproductrice (épis ou panicules) contient entre 60 et 80% de la quantité totale [72, 173]. Ces molécules sont majoritairement trouvées dans l'épillet (plus de 90%) [72].

Les lolines sont produites à des niveaux pouvant atteindre 20 000 mg/kg MS, soit jusqu'à 1000 fois les teneurs des autres alcaloïdes [143, 173]. Elles peuvent représenter jusqu'à 2% de la matière sèche totale de la plante hôte [126].

La péramine

De tous les alcaloïdes, la péramine est celle dont la répartition dans la plante hôte est la plus homogène. Dans le ray grass anglais endophyté avec *N. lolii*, les niveaux en péramine sont voisins de 20 mg/kg MS de la base à la pointe des feuilles [5, 74, 153]. Cette mycotoxine peut également se trouver dans les racines (3,7 mg/kg) [49]. La répartition homogène de la péramine serait due à son hydrosolubilité permettant sa translocation et sa dispersion dans toute la plante [5, 75, 151, 153].

Ainsi, la répartition des différentes mycotoxines dans la graminée hôte est hétérogène et variable en fonction du type d'alcaloïdes. Certaines études montrent que pour un tissu donné il existe une relation linéaire entre la quantité de *Neotyphodium* et la concentration en alcaloïdes *in planta* [118-119]. Cette relation est moins marquée à l'échelle de la plante entière ou en fonction de l'âge des tissus [119, 153].

FACTEURS DE VARIATIONS DES TENEURS EN ALCALOÏDES

La nature et la quantité d'alcaloïdes présents dépendent de facteurs intrinsèques (génotypes plante/champignon, tissu végétal...) et extrinsèques (disponibilités en eau, minéraux, saisons...).

FACTEURS INTRINSÈQUES

Le génotype du champignon

Des variations intra et inter-espèces déterminent le ou les types d'alcaloïdes pouvant être produits [15, 19, 83]. Les *Neotyphodium* possèdent ou non les gènes nécessaires à la synthèse des mycotoxines. Par exemple, à l'inverse de *N. lolii*, *N. australiense* ne possède pas un des gènes permettant la synthèse de toxines appartenant au groupe des AE (*dmaW*). De la même manière, la souche CBS109346 de *N. australiense* dispose du gène *ltm* de synthèse d'indole- diterpènes contrairement à la souche CBS109347 [144].

Le génotype de la plante

Le type de mycotoxine produit par une espèce ou une souche de champignon peut varier selon l'espèce ou la souche végétale colonisée [63, 83, 148]. Par exemple, *N. coenophialum* est capable de produire des AE en association avec *L. arundinaceum* alors qu'il ne le peut pas avec *P. autumnalis*. De même, *N. starrii* ne produit aucune toxine avec *F. obtusa* alors qu'en symbiose avec *B. anomalus* il produit des AE et de la péramine. Le génotype de la plante peut également déterminer la quantité d'alcaloïdes produite [39, 46, 153].

FACTEURS EXTRINSÈQUES

Variations saisonnières

Les teneurs en ergovaline, lolitrème B et lolines dans les plantes suivent des variations saisonnières similaires à celles qui déterminent la croissance végétale tout au long de l'année, aussi bien pour les variétés cultivées que les variétés indigènes [46, 48, 83, 131, 153, 155]. Les teneurs les plus faibles apparaissent en hiver et les plus élevées à l'été et à l'automne [4, 72, 129]. Ces variations sont moins marquées pour la péramine [4].

En présence d'un stress

De nombreux facteurs extrinsèques lorsqu'ils sont en excès ou en déficit comme l'eau et les minéraux, la température ambiante, le CO₂ atmosphérique, les ultraviolets, le pâturage et la fauche, provoquent un stress de la plante hôte ou du champignon. De nombreuses études se sont portées sur l'influence de ces différents facteurs sur la synthèse des mycotoxines par *Neotyphodium*. Elles ont principalement été effectuées avec des variétés agronomiques de graminées endophytées (ray grass anglais / *N. lolii*, fétuque élevée / *N. coenophialum*). Le tableau 4 illustre les effets de ces facteurs isolés (déficit hydrique, augmentations de la température ambiante ou du CO₂ atmosphérique...) ou combinés (déficit hydrique et apports azotés) sur la production d'ergovaline (ou alcaloïdes de l'ergot totaux), du lolitrème B, de la péramine et des lolines. Les résultats obtenus sont très hétérogènes et contradictoires. Ils peuvent varier d'une toxine à l'autre (exemple de l'ergovaline et de la péramine avec un déficit hydrique) ou pour une même toxine (exemple de la péramine retrouvée en grande ou faible quantités par rapport aux témoins). Ces effets peuvent s'expliquer par des conditions expérimentales variables et des différences liées à la quantité de *Neotyphodium* par unité de tissu végétal (concentration en endophyte *per se*) ou la production en alcaloïdes par unité de champignon (voies de biosynthèse *per se*) [119].

Par exemple, les quantités en AE totaux et en lolines dans la fétuque élevée endophytée diminuent de 30% lors d'une augmentation de la pression atmosphérique en CO₂ ([CO₂ atmosphérique] + 300 ppmv) [17]. Mais, étant donnée l'augmentation de l'activité photosynthétique liée à l'orientation de la plante, il est probable que cette situation favorise le développement de la masse végétale plutôt que la croissance mycélienne et par conséquent conduise à un effet de dilution des mycotoxines. De la même manière, le lolitrème B et la péramine sont retrouvés en moins grandes quantités dans des ray grass anglais endophytés cultivés avec des apports azotés élevés [69, 118]. Ce type d'apport implique l'augmentation de la masse végétale [69] qui pourrait alors expliquer un phénomène de dilution des toxines [118].

Teneur en toxine dans la plante *	Ergovaline ou AE	Lolitrème B	Péramine	Lolines
Supérieure	Déficit hydrique [7, 24, 63] Déficit hydrique* Apports N [24] Apports en N, P [24, 88, 89, 129] Température [40]	Déficit hydrique [40, 63]	Apports en N [76]	Déficit hydrique [7, 17] Température ⁽¹⁾ [17] Ravageurs ⁽²⁾ [158] Fauche ⁽³⁾ [18]
Inférieure	Fauche ⁽³⁾ [138] CO ₂ ⁽⁴⁾ [17] Apports en N [69]	Apports en N [118] Température ⁽¹⁾ [40]	Apports en N [69, 118]	CO ₂ ⁽⁴⁾ [17]
Équivalente	Apports en N, P [118] Température ⁽¹⁾ [17]	Apports en N [69]	Déficit hydrique [40, 63] Température ⁽¹⁾ [40]	Ultraviolets [97]

* : En comparaison aux quantités retrouvées dans la plante hôte se développant en conditions classiques de culture

AE : toxine du groupe des alcaloïdes de l'ergot, N : azote, P : phosphore,

⁽¹⁾ : augmentation de la température ambiante ; ⁽²⁾ : *Spodoptera frugiperda*, 2 semaines d'exposition ; ⁽³⁾ : augmentation fréquence de fauche ; ⁽⁴⁾ : augmentation concentration de CO₂ atmosphérique

TABLEAU IV : Influence de facteurs extrinsèques sur la synthèse des principaux alcaloïdes

LES *NEOTYPHODIUM* : GÉNÉRALITÉS ET CONTEXTE FRANÇAIS.

Des études se sont également portées sur l'expression des gènes des voies de biosynthèse. Le passage de ravageurs (*S. frugiperda*) pendant 2 semaines sur des parcelles de fétuque élevée endophytée, augmente l'expression du gène *lolC* codant pour la synthèse des lolines [158]. En revanche, un important déficit hydrique réalisé sur du ray grass anglais endophyté ne modifie pas l'activité des gènes *lpsA* (ergovaline) et *lrmG* (lolitrème B) [63]. De nombreuses régulations épigénétiques peuvent être à l'origine de variations inexplicées de l'expression des gènes de ces voies de synthèse [16, 167].

RÔLES ÉCOLOGIQUES

Bien que difficile à démontrer, la synthèse de mycotoxines dans les plantes endophytées constituerait un avantage écologique majeur pour la graminée en améliorant sa résistance aux herbivores, aux ravageurs, aux microbes et à la sécheresse.

Résistance aux herbivores

Les effets anti-mammifères sont attribués aux indole-diterpènes (lolitrème B) et aux alcaloïdes ergotiques (ergovaline). Deux hypothèses ont été avancées :

- un refus de consommation, mis en évidence dans une étude sur des lapins consommant du ray-grass anglais endophyté. L'ergovaline diminue l'appétit et les clavines réduisent l'appétence de l'aliment [114].
- un évitement des plantes par l'ensemble du troupeau [100].

Ces hypothèses seraient en accord avec le faible nombre de cas d'intoxication d'animaux pâturant des graminées indigènes depuis plus de 100 ans [45].

Résistance aux ravageurs

De nombreuses études ont été réalisées pour comprendre les phénomènes de résistance des plantes endophytées aux ravageurs. La majorité de ces études ont été effectuées sur des variétés fourragères telles que le ray-grass anglais et la fétuque élevée. Dans la plupart des cas elles ont mis en évidence une amélioration de la résistance [134].

Le tableau 5 illustre les effets biologiques (augmentation du taux de mortalité, diminution du poids) de certains alcaloïdes produits par les *Neotyphodium* (péramine, lolines, AE, lolitrème B) sur les larves et/ou les adultes de plusieurs insectes ou acariens ravageurs de culture.

Les résultats de ces études sont relativement homogènes concernant les effets sur le stade adulte. Quelque soit le type d'alcaloïde testé, la consommation de plantes endophytées augmente le taux de mortalité [6, 20, 98, 116-117, 126, 148, 158], et diminue la consommation globale de graminées [130, 158, 161]. Les résultats sur le stade larvaire d'insectes ravageurs sont moins nombreux et plus hétérogènes. Plutôt qu'un effet léthal, les alcaloïdes semblent ralentir la croissance et le développement de certains insectes à différents stades larvaires [6, 26, 126, 158].

Les résultats concernant les effets des endophytes présents dans les graminées sauvages sur leurs ravageurs naturels sont peu nombreux et contradictoires, montrant une amélioration des capacités de résistance ou une absence d'effet [24, 25].

Ainsi, s'il est communément admis que la synthèse de mycotoxines par *Neotyphodium* permet aux graminées endophytées de résister aux ravageurs, cet avantage peut ou

Effets biologiques	Molécules étudiées			
	Péramine	Lolines	Lolitrème B	Groupe des AE
Chez les adultes :				
↗ taux de mortalité	<i>S. frugiperda</i> [6] <i>Sc. graminum</i> [148] <i>T. castaneum</i> [20] <i>L. bonariensis</i> [130]	<i>R. padi</i> [24,148,158] <i>Sc. graminum</i> [126] <i>C. zealandica</i> [116]	<i>R. padi</i> [98] <i>M. dirhodum</i> [98]	<i>Te. cinnabarinus</i> [180] <i>R. padi</i> [180] <i>A. lentisci</i> [117]
↘ poids				
↘ fécondité				
↘ consommation plantes E+	<i>L. bonariensis</i> [130,161]	<i>C. zealandica</i> [116]	<i>R. padi</i> [98]	<i>Te. cinnabarinus</i> [180] <i>R. padi</i> [180] <i>Me. aciculatus</i> [180]
Chez les larves :				
↗ taux de mortalité				
↗ jours nymphose, éclosion				
↘ poids	<i>S. frugiperda</i> [6]	<i>S. frugiperda</i> [26] <i>S. frugiperda</i> [26] <i>S. frugiperda</i> [6,26,126] <i>C. zealandica</i> [158]		
↘ consommation plantes E+	<i>S. frugiperda</i> [6]			

↗ : augmentation ; ↘ : diminution ; E+ : endophytées

A. : *Aploneura* ; C. : *Costelytra* ; L. : *Listronotus* ; M. : *Metopolophium* ; Me : *Messor* ; R. : *Rhopalosiphum* ; S. : *Spodoptera* ; Sc. : *Schizaphis* ; T. : *Tribolium* ; Te. : *Tetranychus*

TABLEAU V : Effets biologiques des mycotoxines produites par *Neotyphodium* sur les ravageurs de culture

non s'exprimer selon la nature et de la quantité d'alcaloïde produit, et l'espèce de ravageur.

Effets antimicrobiens

La production d'alcaloïdes par *Neotyphodium* permettrait à la plante hôte de mieux résister à certains pathogènes : champignon, levures, bactéries, virus. Des études ont montré que certaines mycotoxines avaient une activité antimicrobienne en culture et dans la plante [24, 177]. Cependant les résultats obtenus en serre sont contrastés, certains montrent des avantages pour les plantes hôtes [24, 82] d'autres aucun effet voire un effet négatif [24, 168].

Tolérance à la sécheresse

Les lolines modifieraient le potentiel osmotique du végétal et pourraient de ce fait diminuer les effets du stress hydrique [19]. Ces résultats, qui sont à relier à l'effet du stress hydrique sur la production de toxine, restent à confirmer.

Depuis les années 1980, des études ont été menées pour comprendre le ou les rôles écologiques des mycotoxines de *Neotyphodium*. Alors que ces molécules ne semblent pas avoir d'effet net sur la résistance des graminées endophytées aux herbivores, aux infections et à la sécheresse, elles paraissent les protéger contre les insectes et nématodes ravageurs. Toutefois, cette protection dépend fortement du type d'association plante/champignon, des quantités de mycotoxines synthétisées et de l'abondance et du type de ravageurs présents.

MÉTHODES DE DOSAGE

Différentes méthodes ont été mises au point pour détecter la présence des *Neotyphodium* et quantifier les différents alcaloïdes dans les plantes endophytées

DÉTECTION DES *NEOTYPHODIUM*

Du fait de leur cycle de vie strictement endophyte, les *Neotyphodium* doivent pouvoir être détectés dans tous les tissus du végétal. Pour cela, différentes techniques macroscopiques, microscopiques, et « génétiques » sont disponibles.

Méthodes macro et microscopiques

L'isolement sur boîte de Petri permet de confirmer ou d'infirmer la présence du champignon dans les tissus de la graminée. Après avoir été désinfectés (alcool, eau de Javel), les tissus sont découpés en fragments puis déposés sur un milieu de culture [3]. Cette technique peu coûteuse demande toutefois un certain temps, nécessaire à la croissance des *Neotyphodium* (quelques dixièmes de mm par jour) [11] qui peut être ralentie voire stoppée par le développement de certains saprophytes à croissance rapide. De plus, les faux-négatifs sont assez fréquents.

La technique microscopique consiste en la coloration de tissu végétal avec un colorant (bleu d'aniline, bleu trypan, bleu coton ou encore rose Bengale) suivie d'une observation au microscope optique [132]. Elle peut être utilisée avec les graines, les plantules, les tiges, les feuilles, etc. Cette technique, peu onéreuse, est facilement réalisable et ne nécessite pas de matériel spécialisé. Par contre elle requiert de bonnes connaissances morphologiques des *Neotyphodium*, le temps de réalisation est long et les faux-négatifs sont nombreux.

Méthodes immunologiques

Des techniques immuno-enzymatiques (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Tissue Print Immunoblot) ont été mises au point pour détecter la présence du champignon dans la plante [62]. Ces méthodes utilisent deux anticorps : le premier est spécifique de l'antigène d'intérêt alors que le second, qui réagit avec les complexes anticorps-antigène formés, est couplé à une enzyme pour activer un substrat chromogène ou fluorogène. Ces techniques peuvent être spécifiques d'un *Neotyphodium* donné et être utilisées pour toutes les parties de la graminée. Elles sont sensibles et relativement rapides du fait de l'existence de kits commerciaux.

Méthodes génétiques

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est la technique moléculaire la plus fréquemment utilisée [35, 36]. Elle consiste en l'amplification d'un fragment du gène *TEF* (*Translation Elongation Factor*) [35], et permet de détecter les champignons dans tous types de tissus végétaux. La méthode est rapide, spécifique, puisque chaque fragment amplifié aura une taille différente selon l'espèce, et sensible, puisque seuls quelques picogrammes d'ADN dans un échantillon suffisent. En revanche les amorces doivent être judicieusement choisies pour permettre une bonne amplification. La possibilité de faux négatifs lors d'infections faibles et hétérogènes rend nécessaire de tester plusieurs échantillons d'une même plante et de répéter plusieurs fois le test, ce qui accroît le coût et le temps d'analyse [37].

OSAGE DES MYCOTOXINES

Les alcaloïdes produits par *Neotyphodium* peuvent être dosés dans différents types de matrice (végétale, animale, etc.) à l'aide de techniques immuno-enzymatiques et/ou chromatographiques (tableau 6).

Alcaloïdes de l'ergot totaux et ergovaline

La technique immuno-enzymatique ELISA permet de détecter des teneurs en AE totaux supérieures à 45 µg AE/kg de matière sèche (MS) [66]. Des techniques chromatographiques sont également utilisées : CCM (chromatographie sur couche mince), HPLC (chromatographie liquide à haute performance) ou UPLC (ultra performance liquid chromatography) avec un détecteur à fluorescence ou par HPLC couplée à un spectromètre de masse. Elles

Molécule / Matrice		Technique	LD (µg/kg)	Référence
Ergovaline				
Herbe	CCM		200	[139]
		HPLC-fluo	10	[151]
		UPLC-fluo	16*	[159]
		HPLC-MS	140	[150]
Graines	CCM	500	[165]	
Lolitrème B				
Herbe	ELISA		14000	[55]
		HPLC-fluo	50	[104]
Graines	ELISA	14000	[55]	
Lolines				
Herbe/Graines	CPG		-	[173]
		CPG-MS	-	[72]
Péramine				
Herbe	CCM		1000*	[49]
		HPLC-UV	1000	[130]

CCM : chromatographie sur couche mince, CPG : chromatographie en phase gazeuse, ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay, fluo : fluorimétrie, HPLC : chromatographie liquide haute performance, LD : limite de détection, MS : spectromètre de masse, UPLC : chromatographie liquide à ultra haute performance

- : absence de donnée

* : limite de détection calculée à partir de la limite de quantification (LQ) disponible (LD calculée = LQ/3)

TABLEAU VI : Méthodes d'analyse et limites de détection des principaux alcaloïdes produits par *Neotyphodium* dans différentes matrices.

sont généralement précédées d'une extraction avec un ou plusieurs solvants organiques (souvent du chloroforme) suivie ou non d'une étape de purification. La moins sensible de ces techniques est à la CCM, la limite de quantification (LQ) est de 200 µg ergovaline / kg MS [139]. Les méthodes utilisant l'HPLC et l'UPLC avec détecteur à fluorescence permettent une LQ de 50 µg ergovaline / kg MS [129, 151, 159]. En couplant ces appareils à un spectromètre de masse, il est possible de détecter jusqu'à 140 µg ergovaline / kg MS [150]. Toutes ces techniques sont utilisables dans les graines et le foin, pour détecter des doses toxiques pour les animaux qui sont comprises entre 500 et 800 µg ergovaline / kg MS [164].

Lolitrème B

Le lolitrème B peut être dosé dans les matrices végétales par des techniques ELISA ou HPLC avec détecteur à fluorescence. Toutes ces méthodes sont précédées d'une étape d'extraction en milieu liquide (solvant organique tel le chloroforme ou le dichlorométhane) suivie ou non d'une étape de purification. La technique ELISA permet une LQ de 14 mg lolitrème B / kg MS [55], alors que la méthode HPLC a une LQ de 50 µg / kg MS [104]. Seule la méthode HPLC est assez sensible pour quantifier les teneurs réputées toxiques pour les animaux pâturant : entre 1800 et 2000 µg lolitrème B / kg MS [164].

Lolines

Les lolines peuvent être dosées par chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée ou non à un SM. Elles

sont extraites par des solvants organiques (méthanol, chloroforme...) puis purifiées sur des colonnes en phase solide [11, 72, 163, 173]. Aucune limite de détection ou de quantification n'est proposée dans la littérature.

Péramine

La péramine est dosée dans le foin ou les graines par CCM ou HPLC avec détection UV. Une phase d'extraction (solvant organique de type méthanol, propan-2-ol, etc.) qui peut être suivie ou non d'une étape de purification sur colonne échangeuse d'ions est nécessaire. Les deux méthodes ont des sensibilités similaires, respectivement 1 et 2 mg péramine / kg MS par HPLC et CCM [49, 151]. Ces valeurs sont en adéquation avec les teneurs retrouvées dans les graminées endophytées (autour de 20 mg péramine / kg MS).

Problématique française

Le contexte actuel d'élevage et de production fourragère en France est de moins en moins favorable. Les zones d'élevage se replient sur des zones agricoles difficilement valorisables, le coût des matières premières entrant dans la composition des compléments d'alimentation animale explose, l'utilisation des engrais chimiques est devenue onéreuse. A ces problèmes d'ordres économiques s'ajoute des perspectives climatiques défavorables, à l'origine par exemple de déficits hydriques cumulés importants qui influencent les niveaux de production et la persistance des prairies. Dans ce contexte, le développement de plantes fourragères endophytées présente un intérêt potentiel, objet de différents programmes de recherche.

En 1988, une étude française met en évidence la présence de *Neotyphodium* dans un certain nombre de lots commerciaux de semences [124]. Depuis le début des années 90 différents travaux ont porté sur la symbiose entre les *Neotyphodium* et les graminées sauvages, les cas de toxicoses liés à l'ingestion de fourrages endophytés, la production de mycotoxines par des variétés sauvages ou agronomiques et enfin les avantages agronomiques de cette symbiose dans les conditions pédoclimatiques françaises. Au vu des résultats obtenus et d'études internationales sur le sujet, le CTPS (Comité Technique Permanent de la Sélection) décide en 2001 que toutes les variétés fourragères présentées à l'inscription au Catalogue Officiel ne peuvent abriter plus de 20% d'endophytes vivants. Cependant, aucune législation ne précise de teneurs maximales autorisées en mycotoxines dans les productions [57].

NEOTYPHODIUM SAUVAGES

Plusieurs études ont porté sur *Neotyphodium* en symbiose avec des graminées sauvages françaises. De nouveaux groupes et espèces d'endophytes ont ainsi été découverts [108]. La fréquence de ces champignons a également été étudiée dans différentes populations de graminées sauvages. Une étude sur des ray grass anglais issus de 57 populations récoltées dans toute la France a mis en évidence que plus de 70% de ces graminées abritaient un champignon du genre *Neotyphodium* [85]. Selon les populations, la fréquence d'infection se situe entre 1 et 100% [85]. Des travaux plus récents ont étudié de nombreuses espèces de graminées : *Festuca eskia*, *F. ovina*, *Lolium arundinaceum*, *L. perenne*, *L. rigidum*, *Dactylis glomerata*, *Molinia caerulea*, *Poa pratensis*... La présence du champignon peut varier selon l'espèce végétale de 0 (e.g. *F. pratensis*) à 100% (e.g. *Molinia caerulea*) [87]. Ces variations sont également observées pour différentes populations au sein d'une même espèce végétale. Entre 0 et 87% des échantillons collectés sur 22 populations de ray grass anglais issus du Massif Pyrénéen contiennent un ou plusieurs champignons endophytes [59]. Deux travaux similaires ont observés des taux d'endophytisme équivalent sur des populations de *F. eskia* issus également du Massif pyrénéen [58, 61].

Les variations des niveaux d'endophytisme ont pu être corrélées à certaines variables climatiques comme l'évapotranspiration et la disponibilité en eau [59, 85].

CAS DE TOXICOSES EN FRANCE

Les cas de toxicoses liées à la consommation de fétuque élevée endophytée (ergovaline) sont peu nombreux [71]. Un premier cas a été observé dans un élevage de 120 bovins de race charolaise dans la Vienne (86). Les animaux étaient mis en pâture sur des parcelles monospécifiques de fétuque élevée. Au cours de deux étés successifs particulièrement chauds et secs (1989 et 1990) une dizaine d'animaux ont développés des symptômes d'hyperthermie, amaigrissement, boiterie des postérieurs et nécrose de l'extrémité caudale. L'animal le

plus atteint, un taureau reproducteur, a du être euthanasié. Les analyses effectuées sur les prairies suspectes ont mis en évidence la présence de *Neotyphodium coenophialum* sur plus de 50% de la parcelle la plus contaminée, aucun dosage de toxine n'a été réalisé. Un deuxième cas concernait une vache de race Française Frisonne Pie Noire d'un troupeau laitier de 12 individus dans les Landes (40). Les animaux pâturaient une prairie de fétuque élevée monospécifique implantée 4 ans plus tôt. L'hiver 90 une vache a développé un syndrome de gangrène sèche des extrémités associé à de l'hyperthermie, de l'anorexie, de l'agalaxie, une boiterie des postérieurs et une nécrose caudale. L'arrêt du pâturage sur cette parcelle a permis une guérison rapide. L'examen des tiges fleuries récoltées sur la prairie au printemps 1991 a mis en évidence la présence de *N. coenophialum* à hauteur de 15%. Là encore, aucun dosage d'alcaloïde n'a été réalisé.

Les cas de « ray-grass staggers » impliquant du foin ou des pâtures de ray grass anglais endophyté (lolitrème B) sont peu nombreux [9, 13-14]. En 1998 un premier cas est décrit sur un troupeau de vaches laitières dans les Côtes d'Armor (22) l'été 1997 [13]. Dix vaches âgées de 2 à 12 ans de différentes races (Frisonne française, Normande, Montbéliarde, Pie Rouge) ont développé divers symptômes (tremblements, manque de coordination, perte de poids, mouvements de tête incontrôlés...) après deux semaines de pâturage sur une parcelle de ray-grass anglais semée en 1995. La collecte des échantillons après la période de pâturage (fin septembre 1997) a mis en évidence une contamination de 30% de la parcelle par des *Neotyphodium* et des teneurs en mycotoxines faibles : respectivement 30 et 500 µg/kg MS d'ergovaline et de lolitrème B. Le cas le plus récent impliquait 5 taureaux reproducteurs de race Montbéliarde dans un centre d'insémination artificielle à la fin de l'été 2003 [9]. Ces animaux recevaient en guise de fourrage de la paille de ray-grass anglais cultivé pour la production de semences fourragères. Dix jours après la première distribution, les premiers symptômes sont apparus : tremblements de la tête et du cou, démarche ébrieuse, contracture d'un membre postérieur. Le dosage du lolitrème B de bottes de paille de ray-grass a révélé des teneurs entre 3 et 5 mg/kg MS, soit jusqu'à plus de 2 fois les doses réputées toxiques [164].

PRODUCTION DE MYCOTOXINES

Endophytisme sauvage

Peu d'informations sont disponibles concernant les teneurs en mycotoxines produites par des *Neotyphodium* en symbiose avec des graminées sauvages. Une étude révèle que des ray grass anglais récoltés sur différents sites français pouvaient contenir plus de 3mg ergovaline/kg MS, près de 6 mg lolitrème B/kg MS et jusqu'à 53 mg péramine/kg MS [15]. Les teneurs en lolitrème B retrouvées en France sont comparables à celles retrouvées dans les ray grass anglais récoltés en Grande-Bretagne (entre 3 et 10 mg lolitrème B / kg) [84] alors que des échantillons allemands de révèlent des concentrations près de 6 fois inférieures [111]. Différentes

LES *NEOTYPHODIUM* : GÉNÉRALITÉS ET CONTEXTE FRANÇAIS.

études américaines ou néo-zélandaises sur *L. perenne* décrivent des concentrations en lolitrème B, ergovaline et péramine similaires à celles retrouvées en France [19, 148, 163].

Expérimentations

D'autres études se sont intéressées à la culture en plein champ de certaines variétés agronomiques de ray grass anglais et de fétuque élevée endophytés [14, 38, 43, 123]. Dans le Sud Ouest de la France (Rodez, Aveyron) les teneurs maximales en ergovaline et lolitrème B ont été atteintes à la fin du printemps et/ou à l'automne [14, 38]. Ces variations saisonnières sont similaires à celles observées pour ces graminées endophytées cultivées aux USA, Nouvelle-Zélande et Australie [46, 48, 83, 131, 153, 155].

Les concentrations observées au cours de ces études ont, dans les conditions de pire cas (récolte tardive des fourrages) atteint voire dépassé les seuils réputés toxiques pour les ovins et bovins, soit 500 µg ergovaline/kg MS de fétuque élevée et 1800 µg lolitrème B/kg MS de ray-grass anglais [14, 43, 164]. Ces niveaux élevés ont pu être observés sur des parcelles mono espèces de certains cultivars de fétuque élevée ou de ray-grass anglais naturellement ou artificiellement endophytés. Ces teneurs ont été obtenus après floraison [5, 74, 131], ce qui ne correspond pas aux pratiques culturales françaises de production de fourrages.

Avantages agronomiques de la symbiose dans les conditions environnementales françaises

Différentes études ont été effectuées au champ pour tester les bénéfices apportés au ray-grass anglais par *Neotyphodium* sous différentes conditions sans apport d'engrais ni irrigation [38, 120, 123]. Ces essais ont été menés sur plusieurs cultivars de ray grass anglais naturellement ou artificiellement endophytés par différentes espèces de champignons. En l'absence de stress, les résultats obtenus sont hétérogènes, le rendement en matière sèche n'ayant été amélioré que pour certains cultivars et certains sites de production la deuxième année de culture [38, 120, 123]. Ces résultats sont en accord avec les études précédemment décrites (paragraphe « Impact de l'endophyte sur le développement végétal »). En conditions stressantes (précipitations faibles et températures moyennes élevées) les résultats obtenus lors de ces études sont homogènes. Ils tendent à montrer une meilleure pérennité et/ou persistance des parcelles endophytées par rapport à celles contenant des graminées non endophytées [38, 123]. Ces paramètres ont été peu étudiés en plein champ mais des résultats similaires ont déjà été décrits [e.g. 24].

Peu d'études au champ ont été réalisées en France pour mettre en évidence les avantages agronomiques de certaines graminées endophytées. Cependant les résultats obtenus sous différentes conditions pédoclimatiques (9 sites répartis du nord au sud-ouest de la France) tendent à montrer que les *Neotyphodium* peuvent améliorer les performances

agronomiques de certains cultivars de ray-grass anglais [38, 120, 123].

Concernant les graminées sauvages, une étude conduite au champ a permis de mettre en évidence que le champignon, en symbiose avec *Festuca eskia*, améliorerait la persistance de la plante hôte, avec des effets variables selon le niveau de ressources disponibles (azote, phosphore et potassium) [58].

Conclusion

Les champignons endophytes du genre *Neotyphodium* sont présents sur tous les continents et colonisent de nombreuses espèces de graminées telles que le ray grass anglais et la fétuque élevée. Ces associations complexes semblent profiter aux champignons, auxquels la graminée procure protection, nutrition et favorise la reproduction. Les bénéfices que la plante pourrait retirer de cette association sont moins évidents. En effet, même si des avantages agronomiques (amélioration de la croissance et du rendement photosynthétique) ont été démontrés, ils semblent varier en fonction de facteurs intrinsèques (couple plante- champignon) et extrinsèques (pédoclimat, stress abiotiques). L'avantage principal de l'association pour la plante semble finalement lié à la production de mycotoxines par les champignons dont certaines présentent des propriétés toxiques et/ou répulsives vis-à-vis d'un certain nombre de ravageurs. Ces associations sont également à l'origine de la production de composés responsables de toxicoses sur les animaux (ovins, bovins, équins...). La biosynthèse de ces molécules est complexe, plus d'une quarantaine de molécules ayant été identifiées dont les principales sont l'ergovaline, le lolitrème B, la N-formyllooline, la N-acétyllooline et la péramine. Les quantités produites sont très variables et dépendent de nombreux facteurs intrinsèques, tels que le génotype du champignon et de la plante, et extrinsèques, tels les déficits hydriques, thermiques ou encore nutritionnels.

En France, bien qu'un taux important d'endophytisme soit rapporté sur des variétés sauvages de graminées, très peu de cas de toxicoses ont été répertoriés.

Références

1. ARACHEVALETA M., BACON C., HOVELAND C., RADCLIFFE D.: Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. *Agron. J.*, 1989, **81**, 83-90.
2. BACON C., DE BATTISTA J.: Endophytic fungi of grasses. In: AVORA D., RAI B., MUKERJI K., KNUDSEN G. (Eds.): Soil and plants, Marcel Dekker, New York, 1990, 231-256.
3. BACON C., WHITE C.: Stains, media and procedures for analyzing endophytes. In : BACON C., WHITE J. Jr. (Eds): Biotechnology of endophytic fungi of grasses, CRC Press, 1994, 47-56.
4. BALLO., PRESTIDGER., SPROSEN J.: Interrelationships between *Acremonium lolii*, peramine, and lolitrem B in

- perennial ryegrass. *Appl. Environ. Microb.*, 1995, **61**, 1527-1533.
5. BALL O., BARKER G., PRESTIDGE R., SPROSEN J.: Distribution and accumulation of the mycotoxin lolitrem B in *Neotyphodium lolii*-infected perennial ryegrass. *J. Chem. Ecol.*, 1997, **23**, 1435-1449.
 6. BALL O., COUDRON T., TAPPER B., DAVIES E., TRENTLY D., BUSH L., GWINN K., POPAY A.: Importance of host plant species, *Neotyphodium* endophyte isolate, and alkaloids on feeding by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *J. Econ. Entomol.*, 2006, **99**, 1462-1473.
 7. BELESKY D., STRINGER W., HILL N.: Influence of endophyte and water regime upon tall fescue accessions. I. Growth characteristics. *Ann. Bot.*, 1989, **63**, 495-503.
 8. BELESKY D., MALINOWSKI D.: Abiotic stresses and morphological plasticity and chemical adaptations of *Neotyphodium*-infected tall fescue plants. In: BACON C., WHITE J. Jr. (Eds.): Microbial endophytes, Marcel Dekker, New York, 2000, 455-485.
 9. BENKHELIL A., GRANCHER D., GIRAUD N., BEZILLE P., BONY S.: Intoxication par des toxines de champignons endophytes chez des taureaux reproducteurs. *Revue Med. Vet.*, 2004, **156**, 243-247.
 10. BERTONIM., CABRALD., ROMERON., DUBCOVSKY J.: Endophitos fungicos en especies SudAmericanas de *Festuca* (Poaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botanica*, 1993, **39**, 25-34.
 11. BLANKENSHIP J., SPIERING M., WILKINSON H., FANNIN F., BUSH L., SCHARDL C.: Production of loline alkaloids by the grass endophyte, *Neotyphodium uncinatum*, in defined media. *Phytochemistry*, 2001, **58**, 395-401.
 12. BLANKENSHIP J., HOUSEKNECHT J., PAL S., BUSH L., GROSSMAN R., SCHARDL C.: Biosynthetic precursors of fungal pyrrolizidines, the loline alkaloids. *ChemBioChem*, 2005, **6**, 1016-1022.
 13. BONY S., COLLIN E., PERRET DU CRAY G., RAVEL C., DELATOUR P.: Endophyte toxicosis : Observations on an outbreak of « ryegrass staggers » in a dairy cow herd in France. *Revue Med. Vet.*, 1998, **6**, 628.
 14. BONY S., EMILE J-C., DURIX A., RAVEL C.; GUILLAUMIN J-J.; GHESQUIERE M.: Incidences des toxines de champignons endophytes des graminées sur les herbivores en conditions européenne. *Renc. Rech. Ruminants*, 2001, **8**, 149-152.
 15. BONY S., PICHON N., RAVEL C., DURIX A., BALFOURIER F., GUILLAUMIN J-J.: The relationship between mycotoxin synthesis and isolate morphology in fungal endophytes of *Lolium perenne*. *New Phytol.*, 2001, **152**, 125-137.
 16. BRAKHAGE A.: Regulation of fungal secondary metabolism. *Microbiology*, 2013, **11**, 21-32.
 17. BROSI G., McCULLEY R., BUSH L., NELSON J., CLASSEN A., NORBY R.: Effects of multiple climate change factors on the tall fescue-fungal endophyte symbiosis: infection frequency and tissue chemistry. *New Phytol.*, 2011, **189**, 797-805.
 18. BULTMAN T., BELL G., MARTIN W.: A fungal endophyte mediates reversal of wound-induced resistance and constrains tolerance in a grass. *Ecology*, 2004, **85**, 679-685.
 19. BUSH P., WILKINSON H., SCHARDL C.: Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiol.*, 1997, **114**, 1-7.
 20. CHEPLICK G., CLAY K.: Acquired chemical defences in grasses: the role of fungal endophytes. *Oikos*, 1988, **52**, 309-318.
 21. CHEPLICK G., CLAY K., MARKS S.: Interactions between infection by endophytic fungi and nutrient limitation in the grasses *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. *New Phytol.*, 1989, **111**, 89-97.
 22. CHEPLICK G.: Effect of simulated acid rain on the mutualism between tall fescue (*Festuca arundinacea*) and an endophytic fungus (*Acremonium coenophialum*). *Int. J. Plant Sci.*, 1993, **154**, 134-143.
 23. CHEPLICK G.: Costs of fungal endophyte infection in *Lolium perenne* genotypes from Eurasia and North Africa under extreme resource limitation. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, **60**, 202-210.
 24. CHEPLICK G., FAETH S.: Ecology and evolution of the grass- endophyte symbiosis, 241 pages, Oxford University Press, New York, USA, 2009.
 25. CHRISTENSEN M., BENNETT R., SCHMID J.: Growth of *Epichloë / Neotyphodium* and p-endophytes in leaves of *Lolium* and *Festuca* grasses. *Mycol. Res.*, 2002, **106**, 93-106.
 26. CLAY K., HARDY T., HAMMOND A. Jr.: Fungal endophytes of grasses and their effects on an insect herbivore. *Oecologia*, 1985, **66**, 1-5.
 27. CLAY K.: Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. *Oecologia*, 1987, **73**, 358-362.
 28. CLAY K.: Fungal endophytes of grasses. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 1990, **21**, 275-297.
 29. CLAY K., SCHARDL C.: Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist*, 2002, **160**, 99-127.
 30. CLAY K.: Fungi and the food of the gods. *Nature*, 2004, **427**, 401-402.
 31. CLAY K., HOLAH J., RUDGERS J.: Herbivores cause a rapid increase in hereditary symbiosis and alter plant community composition. *PNAS*, 2005, **102**, 12465-12470.
 32. CLEMENT S., ELBERSON L., YOUSSEF N., DAVITT C., DOSS R.: Incidence and diversity of *Neotyphodium* fungal endophytes in tall fescue from Morocco, Tunisia, and Sardinia. *Crop Sci.*, 2001, **41**, 570-576.
 33. CLEMENT S., ELBERSON L., BOSQUE-PEREZ N., SCHOTZKO D.: Detrimental and neutral effects of wild barley-*Neotyphodium* fungal associations on insect survival. *Entomol. Exp. Appl.*, 2005, **114**, 119-125.

LES *NEOTYPHODIUM* : GÉNÉRALITÉS ET CONTEXTE FRANÇAIS.

34. COMPANT S., REITER B., SESSITSCH A., NOWAK J., CLEMENT C., BARKA E.: Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 1685-1693.
35. DOMBROWSKI J., BALDWIN J., AZEVEDO M., BANOWETZ G.: A sensitive PCR-based assay to detect *Neotyphodium* fungi in seed and plant tissue of tall fescue and ryegrass species. *Crop Sci.*, 2006, **46**, 1064-1070.
36. DOSS R., WELTY R.: A polymerase chain reaction-based procedure for detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue. *Phytopathology*, 1995, **85**, 913-917.
37. DOSS R., CLEMENT S., KUY S., WELTY R.: A PCR-based technique for detection of *Neotyphodium* endophytes in diverse accessions of tall fescue. *Plant Dis.*, 1998, **82**, 738-740.
38. DURIX A., RAVEL C., BONY S., BALFOURIER F., GUILLAUMIN J-J., GHESQUIERE M., CHOSSON J-F., CHARMET G.: The influence of toxic *Neotyphodium* endophytes on perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Revue Med. Vet.*, 1998, **6**, 528.
39. EASTON H., LATCH G., TAPPER B., BALL O.: Ryegrass host genetic control of concentrations of endophyte-derived alkaloids. *Crop Sci.*, 2002, **42**, 51-57.
40. EERENS J., LUCAS R., EASTON S., WHITE J.: Influence of the endophyte (*Neotyphodium lolii*) on morphology, physiology, and alkaloid synthesis of perennial ryegrass during high temperature and water stress. *New Zeal. J. Agr. Res.*, 1998, **41**, 219-226.
41. EFSA: Ergot alkaloids in food and feed. *EFSA Journal*, 2012, **10**, 158p.
42. ELMI A., WEST C.: Endophyte infection effects on stomatal conductance, osmotic adjustment, and drought recovery of tall fescue. *Grass Forage Sci.*, 1995, **131**, 61-67.
43. EMILE J-C., BONY S., GHESQUIERE M.: Influence of consumption in endophyte-infested tall fescue on performance of heifers and lambs. *J. Anim. Sci.*, 2000, **78**, 358-364.
44. EZRA D., HESS W., STROBEL G.: New endophytic isolates of *Muscodora albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology*, 2004, **150**, 4023-4031.
45. FAETH S.: Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *Oikos*, 2002, **98**, 25-36.
46. FAETH S., BUSH L., SULLIVAN T.: Peramine alkaloid variation in *Neotyphodium*-infected Arizona fescue: Effects of endophyte and host genotype and environment. *J. Chem. Ecol.*, 2002, **28**, 1511-1526.
47. FAETH S., HAASE S., SACKETT S., SULLIVAN T., KEITHLEY R., HAMILTON C.: Does fire maintain symbiotic, fungal endophyte infections in native grasses? *Symbiosis*, 2002, **32**, 211-228. (tableau)
48. FAETH S., GARDNER D., HAYES C., JANI A., WITTLINGER S., JONES T.: Temporal and spatial variation in alkaloid levels in *Achnatherum robustum*, a native grass infected with the endophyte *Neotyphodium*. *J. Chem. Ecol.*, 2006, **32**, 307-324.
49. FANNIN F., BUSH L., SIEGEL M., ROWAN D.: Analysis of peramine in fungal endophyte-infected grasses by reversed-phase thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1990, **503**, 288-292.
50. FELLER I.: Effects of nutrient enrichment on growth and herbivory of dwarf red mangrove (*Rhizophora mangle*). *Ecol. Monogr*, 1995, **65**, 477-505.
51. FLETCHER L.: Novel endophytes in New Zealand grazing systems: The perfect solution or a compromise? In: YOUNG C., AIKEN G., McCULLY R., STRICKLAND J., SCHARDL C. (Eds.): *Epichloae, endophytes of cool season grasses: Implications, utilization and biology*, MSA ISFEG, Lexington, 2010, 5-13.
52. RANCIS S., BAIRD D.: Increase in the proportion of endophyte-infected perennial ryegrass plants in overdrilled pastures. *New Zeal. J. Agr. Res.*, 1989, **32**, 437-440.
53. GALLAGHER R., WHITE E., MORTIMER P.: Ryegrass staggers: isolation of potent neurotoxins lolitrem A and lolitrem B from staggers-producing pastures. *New Zeal. Vet. J.*, 1981, **29**, 189-190.
54. GALLAGHER R., HAWKES A.: The potent tremorgenic neurotoxins lolitrem B and aflatrem: A comparison of the tremor response in mice. *Experientia*, 1986, **42**, 823-825.
55. GARTHWAITE I., SPROSEN J., BRIGGS L., COLLIN R., TOWERS N.: Food quality on the farm: Immunological detection of mycotoxins in New Zealand pastoral agriculture. *Food Agric. Immunol.*, 1994, **6**, 123-129.
56. GATENBY W., MUNDAY-FINCH S., WILKINS A., MILES C.: Terpendole M, a novel indole-diterpenoid isolated from *Lolium perenne* infected with the endophytic fungus *Neotyphodium lolii*. *J. Agri. Food Chem.*, 1999, **47**, 1092-1097.
57. GENSOLLEN V., STRAEBLER M., DE GOYON B., HUYGHE C., TESSIER R.: Les évolutions réglementaires dans le domaine des variétés et des semences. *Fourrages*, 2005, **182**, 237-244.
58. GIBERT A., MAGDA D., HAZARD L.: Endophytic fungus fine-tunes the persistence strategy of its alpine host grass in response to soil resource levels. *Oikos*, 2012, **122**, 367-376.
59. GIBERT A., VOLAIRE F., BARRE P., HAZARD L.: A fungal endophyte reinforces population adaptive differentiation in its host grass species. *New Phytol.*, 2012, **194**, 561-571.
60. GLENN A., BACON C., PRICE R., HANLIN R.: Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia*, 1996, **88**, 369-383.
61. GONZALO-TURPIN H., BARRE P., GIBERT A., GRISARD A., WEST C., HAZARD L.: Co-occurring patterns of endophyte infection and genetic structure in the alpine grass, *Festuca eskia*: implications for seed sourcing in ecological restoration. *Conserv. Genet.*, 2010, **11**, 877-887.
62. GWINN K., COLLINS-SHEPARD M., REDDICK B.: Tissue print-immunoblot, an accurate method for the

- detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue. *Phytopathology*, 1991, **81**, 747-748.
63. HAHN H., McMANUS M., WARNSTORFF K., MONAHAN B., YOUNG C., DAVIES E., TAPPER B., SCOTT B.: *Neotyphodium* fungal endophytes confer physiological protection to perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) subjected to a water deficit. *Environ. Exp. Bot.*, 2008, **63**, 183-199.
 64. HERD S., CHRISTENSEN M., SAUNDERS K., SCOTT B., SCHMID J.: Quantitative assessment of *in planta* distribution of metabolic activity and gene expression of an endophytic fungus. *Microbiology*, 1997, **143**, 267-275.
 65. HESSE U., SCHOBERLEIN W., WITTENMAYER L., FORSTER K., WARNSTORFF K., DIEPENBROCK W., MERBACH W.: Effects of *Neotyphodium* endophytes on growth, reproduction and drought-stress tolerance of three *Lolium perenne* L. genotypes. *Grass Forage Sci.*, 2003, **58**, 407-415.
 66. HILL N., AGEE C.: Detection of ergoline alkaloids in endophyte-infected tall fescue by immunoassay. *Crop Sci.*, 1994, **34**, 530-534.
 67. HILL N., PACHON J., BACON C.: *Acremonium coenophialum*-mediated short- and long-term drought acclimation in tall fescue. *Crop Sci.*, 1996, **36**, 665-672.
 68. HOVELAND C., DURHAM R., BOUTON J.: Tall fescue response to clipping and competition with no-till seeded alfalfa as affected by fungal endophyte. *Agron. J.*, 1997, **89**, 119-125.
 69. HUNT M., RASMUSSEN S., NEWTON P., PARSONS A., NEWMAN J.: Near-term impacts of elevated CO₂, nitrogen and fungal endophyte-infection on *Lolium perenne* L. growth, chemical composition and alkaloid production. *Plant Cell Environ.*, 2005, **28**, 1345-1354.
 70. IANNONE L., PINGET A., NAGABHYRU P., SCHARDL C., DE BATTISTA J.: Beneficial effects of *Neotyphodium tembladerae* and *Neotyphodium pampeanum* on a wild forage grass. *Grass and Forage Science*, 2012, **67**, 382-390.
 71. ICEAGA F.: Les toxicoses du bétail dues aux *Acremonium*, champignons endophytes, de la fétuque et du ray-grass anglais. Thèse, 1992, Université Paul-Sabatier, Toulouse, 67p.
 72. JUSTUS M., WITTE L., HARTMANN T.: Levels and tissue distribution of loline alkaloids in endophyte-infected *Festuca pratensis*. *Phytochemistry*, 1997, **44**, 51-57.
 73. KEOGH R., LAWRENCE T.: Influence of *Acremonium lolii* presence on emergence and growth of ryegrass seedlings. *New Zeal. J. Agr. Res.*, 1987, **30**, 507-510.
 74. KEOGH R., TAPPER B., FLETCHER R.: Distributions of the fungal endophyte *Acremonium lolii*, and of the alkaloids lolitrem B and peramine, within perennial ryegrass. *New Zeal. J. Agr. Res.*, 1996, **39**, 121-127.
 75. KOULMAN A., LANE G., CHRISTENSEN M., FRASER K., TAPPER B.: Peramine and other fungal alkaloids are exuded in the guttation fluid of endophyte-infected grasses. *Phytochemistry*, 2007, **68**, 355-360.
 76. KRAUSS J., HÄRRI S., BUSH L., HUSI R., BIGLER L., POWER S., MÜLLER C.: Effects of fertilizer, fungal endophytes and plant cultivar on the performance of insect herbivores and their natural enemies. *Funct. Ecol.*, 2007, **21**, 107-116.
 77. KULDAU G., LIU J-S., WHITE J. Jr., SIEGEL M., SCHARDL C.: Molecular systematics of Clavicipitaceae supporting monophyly of genus *Epichloë* and form genus *Ephelis*. *Mycologia*, 1997, **89**, 431-441.
 78. KULDAU G., BACON C.: Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biological Control*, 2008, **46**, 57-71.
 79. LAM C., BELANGER F., WHITE J. Jr., DAIE J.: Invertase activity in *Epichloë* / *Acremonium* fungal endophytes and its possible role in choke disease. *Mycol. Res.*, 1995, **99**, 867-873.
 80. LANE G., CHRISTENSEN M., MILES C.: Co-evolution of fungal endophytes with grasses: the significance of secondary metabolites. In: BACON C., WHITE J. Jr. (Eds.): *Microbial endophytes*, Marcel Dekker, New York, 2000, 341-388.
 81. LATCH G., HUNT W., MUSGRAVE D.: Endophytic fungi affect growth of perennial ryegrass. *New Zeal. J. Agr. Res.*, 1985, **28**, 165-168.
 82. LEHTONEN P., HELANDER M., SIDDIQUI S., LEHTO K., SAIKKONEN K.: Endophytic fungi decrease plant virus infections in meadow ryegrass (*Lolium pretense*). *Biol. Letters*, 2006, **2**, 620-623.
 83. LEUCHTMANN A., SCHMIDT D., BUSH L.: Different levels of protective alkaloids in grasses with stroma-forming and seedtransmitted *Epichloë* / *Neotyphodium* endophytes. *J. Chem. Ecol.*, 2000, **26**, 1025-1036.
 84. LEWIS G., CLEMENTS R.: A survey of ryegrass endophyte (*Acremonium loliae*) in the U.K. and its apparent ineffectuality on a seedling pest. *J. Agri. Sci.*, 1986, **107**, 633-638.
 85. LEWIS G., RAVEL C., NAFFAA W., ASTIER C., CHARMET G.: Occurrence of *Acremonium* endophytes in wild populations of *Lolium* spp. in European countries and a relationship between level of infection and climate in France. *Ann. Appl. Biol.*, 1997, **130**, 227-238.
 86. LEWIS G.: Effects of biotic and abiotic stress on the growth of three genotypes of *Lolium perenne* with and without infection by the fungal endophyte *Neotyphodium lolii*. *Ann. Appl. Biol.*, 2004, **144**, 53-63.
 87. LEYRONAS C., RAYNAL G.: Presence of *Neotyphodium*-like endophytes in European grasses. *Ann. Appl. Biol.*, 2001, **139**, 119-127.
 88. LYONS P., PLATTNER R., BACON C.: Occurrence of peptide and clavine ergot alkaloids in tall fescue grass. *Science*, 1986, **232**, 487-489.
 89. MALINOWSKI D., BELESKY D., HILL N., BALIGAR V., FEDDERS J.: Influence of phosphorus on the growth and ergot alkaloid content of *Neotyphodium coenophialum*-infected tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant Soil*, 1998, **198**, 53-61.
 90. a) MALINOWSKI D., BELESKY D., FEDDERS J.: Endophyte infection may affect the competitive ability of tall fescue grown with red clover. *J. Agron. Crop Sci.*, 1999, **183**, 91-101.

LES *NEOTYPHODIUM* : GÉNÉRALITÉS ET CONTEXTE FRANÇAIS.

91. MALINOWSKI D., BRAUER D., BELESKY D.: The endophyte *Neotyphodium coenophialum* affects root morphology of tall fescue grown under phosphorus deficiency. *J. Agron. Crop Sci.*, 1999, **183**, 53-60.
92. MALINOWSKI D., BELESKY D.: Adaptation of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: Mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Sci.*, 2000, **40**, 923-940.
93. MARKS S., CLAY K.: Physiological responses of *Festuca arundinacea* to fungal endophyte infection. *New Phytol.*, 1996, **133**, 727-733.
94. MARSHALL D., TUNALI B., NELSON R.: Occurrence of fungal endophyte in species of wild *Triticum*. *Crop Sci.*, 1999, **39**, 1507-1512.
95. MAY K., BRYANT M., ZHANG X., AMBROSE B., SCOTT B.: Patterns of expression of a lolitrem biosynthetic gene in the *Epichloë fescucae*-perennial ryegrass symbiosis. *MPMI*, 2008, **21**, 188-197.
96. McCLENNAN E.: The endophytic fungus of *Lolium*. Part I. *Proceedings of the Royal Society, Victoria (NSW)*, 1920, **11**, 252-301.
97. McLEOD A., REY A., NEWSHMAN K., LEWIS G., WOLFERSTAN P.: Effects of elevated ultraviolet radiation and endophytic fungi on plant growth and insect feeding in *Lolium perenne*, *Festuca rubra*, *F. arundinacea* and *F. pratensis*. *J. Photoch. Photobio. B.*, 2001, **62**, 97-107.
98. MEISTER B., KRAUSS J., HÄRRI S., SCHNEIDER V., MÜLLER C.: Fungal endosymbionts affect aphid population size by reduction of adult life span and fecundity. *Basic Appl. Ecol.*, 2006, **7**, 244-252.
99. MILES C., MUNDAY S., WILKINS A., EDE R., TOWERS N.: Larger-scale isolation of lolitrem B and structure determination of lolitrem E. *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42**, 1488-1492.
100. MILES C., DI MENNA M., JACOBS S., GARTHWAITE I., LANE G., PRESTIDGE R., MARSHALL S., WILKINSON H., SCHARDL C., BALL O., LATCH G.: Endophytic fungi in indigenous Australasian grasses associated with toxicity to livestock. *Appl. Environ. Microb.*, 1998, **64**, 601-606.
101. MIRLOHI A., SABZALIAN M., SHARIFNABI B., NEKOUI MK.: Widespread occurrence of *Neotyphodium*-like endophyte in populations of *Bromus tomentellus* Boiss. in Iran. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2006, **256**, 126-131.
102. MONNET F., VAILLANT N., HITMI A., SALLANON H.: Photosynthetic activity of *Lolium perenne* as a function of endophyte status and zinc nutrition. *Funct. Plant Biol.*, 2005, **32**, 131-139.
103. MORSE L., DAY T., FAETH S.: Effect of *Neotyphodium* endophyte infection on growth and leaf gas exchange of Arizona fescue under contrasting water availability regimes. *Environ. Exp. Bot.*, 2002, **48**, 257-268.
104. MOYANO S., LANUZA F., TORRES A., CISTERNAS E., FUENTES M.: Implementation of a method to determine lolitrem B in ryegrass (*Lolium perenne* L.) by liquid chromatography (HPLC). *ChileanJAR*, 2009, **69**, 455-459.
105. MUNDAY-FINCH S., MILES C., WILKINS A., HAWKES A.: Isolation and structure elucidation of lolitrem A, a tremorgenic mycotoxin from perennial ryegrass infected with *Acremonium lolii*. *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**, 1283-1288.
106. MUNDAY-FINCH S., WILKINS A., MILES C., EDE R., THOMSON R.: Structure elucidation of lolitrem F, a naturally occurring stereoisomer of the tremorgenic mycotoxin lolitrem B, isolated from *Lolium perenne* infected with *Acremonium lolii*. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 2782-2788.
107. MUNDAY-FINCH S., WILKINS A., MILES C., TOMODA H., OMURA S.: Isolation and structure elucidation of lolilline, a possible biosynthetic precursor of the lolitrem family of tremorgenic mycotoxins. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 199-204.
108. NAFFAA W., RAVEL C., GUILLAUMIN J.: A new group of endophytes in European grasses. *Ann. Appl. Biol.*, 1998, **132**, 211-226.
109. NEWMAN J., ABNER M., DADO R., GIBSON D., BROOKINGS A., PARSONS A.: Effects of elevated CO₂, nitrogen and fungal endophyte-infection on tall fescue: Growth, photosynthesis, chemical composition and digestibility. *Global Change Biol.*, 2003, **9**, 425-437.
110. NEWSHAM K., LEWIS G., GREENSLADE P., McLEOD A.: *Neotyphodium lolii*, a fungal leaf endophyte, reduces fertility of *Lolium perenne* exposed to elevated UV-B radiation. *Ann. Bot-London*, 1998, **81**, 397-403.
111. OLDENBURG E.: Endophytic fungi and alkaloid production in perennial ryegrass in Germany. *Grass Forage Sci.*, 1987, **52**, 425-431.
112. PANACCIONE D., TAPPER B., LANE G., DAVIES E., FRASER K.: Biochemical outcome of blocking the ergot alkaloid pathway of a grass endophyte. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 6429-6437.
113. PANACCIONE D.: Origins and significance of ergot alkaloid diversity in fungi. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, **251**, 9-17.
114. PANACCIONE D., CIPOLETTI J., SEDLOCK A., BLEMINGS K., SCHARDL C., MACHADO C., SEIDEL G.: Effects of ergot alkaloids on food preference and satiety in rabbits, as assessed with gene-knockout endophytes in perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 4582-4587.
115. PETERS A.: Field and culture studies of *Streblonema macrocystis* new species *Ectocarpales phaeophyceae* from Chile, a sexual endophyte of giant kelp. *Phycologia*, 1991, **30**, 365-377.
116. POPAY A., TOWNSEND R., FLETCHER L.: The effect of endophyte (*Neotyphodium uncinatum*) in meadow fescue on grass grub larvae. *N Z Plant Protect.*, 2003, **56**, 123-128.
117. POPAY A., GERARD P.: Cultivar and endophyte effects on a root aphid, *Aploneura lentisci*, in perennial ryegrass. *N Z Plant Protect.*, 2007, **60**, 223-227.

118. RASMUSSEN S., PARSONS A., BASSETT S., CHRISTENSEN M., HUME D., JOHNSON L., JOHNSON R., SIMPSON W., STACKE C., VOISEY C., XUE H., NEWMAN J.: High nitrogen supply and carbohydrate content reduce fungal endophyte and alkaloid concentration in *Lolium perenne*. *New Phytol.*, 2007, **173**, 787-797.
119. RASMUSSEN S., PARSONS A., NEWMAN J.: Metabolomics analysis of the *Lolium perenne* – *Neotyphodium lolii* symbiosis: More than just alkaloids? *Phytochem. Rev.*, 2009, **8**, 535-550.
120. RAVEL C., BALFOURIER F., BALFOURIER F.: Influence of the fungal endophyte *Acremonium lolii* on agronomic traits of perennial ryegrass in France. *Grass Forage Sci.*, 1995, **50**, 75-80.
121. RAVEL C., COURTY C., COUDRET A., CHARMET G.: Beneficial effects of *Neotyphodium lolii* on the growth and the water status in perennial ryegrass cultivated under nitrogen deficiency or drought stress. *Agronomie*, 1997, **17**, 173-181.
122. RAVEL C., MICHALAKIS Y., CHARMET G.: The effect of imperfect transmission on the frequency of mutualistic seed-borne endophytes in natural populations of grasses. *Oikos*, 1997, **80**, 18-24.
123. RAVEL C., BALFOURIER F., GUILLAUMIN J.: Enhancement of yield and persistence of perennial ryegrass inoculated with one endophyte isolate in France. *Agronomie*, 1999, **19**, 635-644.
124. RAYNAL G., CHAMPION R., SICARD G., DE GOYON B.: Les *Acremonium*, champignons endophytes des graminées, néfastes ou bénéfiques. *Bull. Semences FNAMS*, 1988, **104**, 12-14.
125. REDDY P., LAM C., BELANGER F.: Mutualistic fungal endophytes express a proteinase that is homologous to proteases suspected to be important in fungal pathogenicity. *Plant Physiol.*, 1996, **111**, 1209-1218.
126. RIEDELL W., KIECKHEFER R., PETROSKI R., POWELL R.: Naturally-occurring and synthetic loline alkaloid derivatives: Insect feeding behavior modification and toxicity. *J. Entomol. Sci.*, 1991, **26**, 122-129.
127. RODRIGUEZ R., REDMAN R., HENSON J.: The role of fungal symbionts in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 2004, **9**, 261-272.
128. ROSENBLUETH M., MARTINEZ-ROMERO E.: Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *MPMI*, 2006, **19**, 827-837.
129. ROTTINGHAUS G., GARNER G., CORNELL C., ELLIS J.: HPLC method for quantitating ergovaline in endophyte-infested tall fescue: seasonal variation of ergovaline levels in stems with leaf sheaths, leaf blades, and seed heads. *J. Agric. Food Chem.*, 1991, **39**, 112-115.
130. ROWAN D., DYMOCK J., BRIMBLE M.: Effect of fungal metabolite peramine and analogs on feeding and development of argentine stem weevil (*Listronotus bonariensis*). *J. Chem. Ecol.*, 1990, **16**, 1683-1695.
131. ROYLANCE J., HILL N., AGEE C.: Ergovaline and peramine production in endophyte-infected tall fescue: Independent regulation and effects of plant and endophyte genotype. *J. Chem. Ecol.*, 1994, **20**, 2171-2183.
132. SAHA D., JACKSON M., JOHNSON-CICALESE J.: A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grasses. *Phytopathology*, 1988, **78**, 237-239
133. SAIKIA S., NICHOLSON M., YOUNG C., PARKER E., SCOTT B.: The genetic basis for indole-diterpene chemical diversity in filamentous fungi. *Mycol. Res.*, 2008, **112**, 184-199.
134. SAIKKONEN K., FAETH S., HELANDER M., SULLIVAN T.: Fungal endophytes: Continuum of interactions with host plant. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 1998, **29**, 319-343.
135. SAIKKONEN K., AHLHLOM J., HELANDER M., LEHTIMÄKI S., NIEMELÄINEN O.: Endophytic fungi in wild and cultivated grasses in Finland. *Ecography*, 2000, **23**, 360-366.
136. SAIKKONEN K., WÄLI P., HELANDER M., FAETH S.: Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science*, 2004, **9**, 275-280.
137. SAIKKONEN K., LEHTONEN P., HELANDER M., KORICHEVA J., FAETH S.: Model systems in ecology: Dissecting the endophyte-grass literature. *Trends in Plant Science*, 2006, **11**, 428-433.
138. SALMINEN S., GREWAL P.: Does decreased mowing frequency enhance alkaloid production in endophytic tall fescue and perennial ryegrass? *J. Chem. Ecol.*, 2002, **28**, 939-950.
139. SALVAT A., GODOY H.: A simple thin-layer chromatographic method for the detection of ergovaline in leaf sheaths of tall fescue (*Festuca arundinacea*) infected with *Neotyphodium coenophialum*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2001, **13**, 446-449.
140. SCHARDL C., LEUTCHMANN A., TSAI H-F., COLLETT M., WATT D., SCOTT B.: Origin of a fungal symbiont of perennial ryegrass by interspecific hybridization of a mutualist with the ryegrass choke pathogen, *Epichloë typhina*. *Genetics*, 1994, **136**, 1307-1317.
141. SCHARDL C., LEUCHTMANN A., SPIERING M.: Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2004, **55**, 315-340.
142. SCHARDL C., PANACCIONE D., TUDZYNSKI P.: Ergot alkaloids – Biology and molecular biology. *Alkaloids Chem. Biol.*, 2006, **63**, 45-86.
143. SCHARDL C., GROSSMAN R., NAGABHYRU P., FAULKNER J., MALLIK U.: Loline alkaloids: Currencies of mutualism. *Phytochemistry*, 2007, **68**, 980-996.
144. SCHARDL C., YOUNG C., FAULKNER J., FLOREA S., PAN J.: Chemotypic diversity of epichloae, fungal symbionts of grasses. *Fungal ecology*, 2012, **5**, 331-344.
145. SCHULTHESS F., FAETH S.: Distribution, abundances, and associations of the endophytic fungal community of Arizona fescue (*Festuca arizonica*). *Mycologia*, 1998, **90**, 569-578.
146. SCHULZ B., BOYLE C.: The endophytic continuum. *Mycol. Res.*, 2005, **109**, 661-686.

LES *NEOTYPHODIUM* : GÉNÉRALITÉS ET CONTEXTE FRANÇAIS.

147. SIEGEL M., JOHNSON M., VARNEY D., NESMITH W., BUCKNER R., BUSH L., BURRUS II P., JONES T., BOLING J.: A fungal endophyte in tall fescue: Incidence and dissemination. *Phytopathology*, 1984, **74**, 932-937.
148. SIEGEL M., LATCH G., BUSH L., FANNIN F., ROWAN D., TAPPER B., BACON C., JOHNSON M.: Fungal endophyte-infected grasses: Alkaloid accumulation and aphid response. *J. Chem. Ecol.*, 1990, **16**, 3301-3315.
149. SMITH M., WARREN V., THOMAS B., BROCHU R., ERTEL E., ROHRER S., SCHAEFFER J., SCHMATZ D., PETUCH B., TANG Y., MEINKE P., KACZOROWSKI G., COHEN C.: Nodulisporic acid opens insect glutamate-gated chloride channels: identification of a new high affinity modulator. *Biochemistry-US*, 2000, **39**, 5543-5554.
150. SOBHANI NAJAFABADI A., MOFID M., MOHAMMADI R., MOGHIM S.: Quantification of ergovaline using HPLC and mass spectrometry in Iranian *Neotyphodium* infected tall fescue. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 2010, **5**, 135-143.
151. SPIERING M., DAVIES E., TAPPER B., SCHMID J., LANE G.: Simplified extraction of ergovaline and peramine for analysis of tissue distribution in endophyte-infected grass tillers. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 5856-5862.
152. SPIERING M., WILKINSON H., BLANKENSHIP J., SCHARDL C.: Expressed sequence tags and genes associated with loline alkaloid expression by the fungal endophyte *Neotyphodium uncinatum*. *Fungal Genet. Biol.*, 2002, **36**, 242-254.
153. SPIERING M., LANE G., CHRISTENSEN M., SCHMID J.: Distribution of the fungal endophyte *Neotyphodium lolii* is not a major determinant of the distribution of fungal alkaloids in *Lolium perenne* plants. *Phytochemistry*, 2005, **66**, 195-202.
154. SPIERING M., MOON C., WILKINSON H., SCHARDL C.: Gene clusters for insecticidal loline alkaloids in the grass-endophytic fungus *Neotyphodium uncinatum*. *Genetics*, 2005, **169**, 1403-1414.
155. SPIERING M., GREER D., SCHMID J.: Effects of the fungal endophyte, *Neotyphodium lolii*, on net photosynthesis and growth rates of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) are independent of *in planta* endophyte concentration. *Annals of Botany*, 2006, **98**, 379-387.
156. STONE J., BACON C., WHITE J. Jr.: An overview of endophytic microbes: Endophytism defined. In: BACON C., WHITE J. Jr. (Eds.): *Microbial endophytes*, Marcel Dekker, New York, 2000, 3-29.
157. SUGAWARA K., OHKUBO H., YAMASHITA M., MIKOSHIBA Y.: Flowers for *Neotyphodium* endophytes detection: a new observation method using flowers of host grasses. *Mycoscience*, 2004, **45**, 222-226.
158. SULLIVAN T., RODSTROM J., VANDOP J., LIBRIZZI J., GRAHAM C., SCHARDL C., BULTMAN T.: Symbiont-mediated changes in *Lolium arundinaceum* inducible defenses: evidence from changes in gene expression and leaf composition. *New Phytol.*, 2007, **176**, 673-679.
159. TAKACH J., MITTAL S., SWOBODA G., BRIGHT S., TRAMMELL M., HOPKINS A., YOUNG C.: Genotypic and chemotypic diversity of *Neotyphodium* endophytes in tall fescue from Greece. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, **78**, 5501-5510.
160. TAN Y., SPIERING M., SCOTT V., LANE G., CHRISTENSEN M., SCHMID J.: *In planta* regulation of extension of an endophytic fungus and maintenance of high metabolic rates in its mycelium in the absence of apical extension. *Appl. Environ. Microb.*, 2001, **67**, 5377-5383.
161. TANAKA A., TAPPER B., POPAY A., PARKER E., SCOTT B.: A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory. *Mol. Microbiol.*, 2005, **57**, 1036-1050.
162. TANAKA A., CHRISTENSEN M., TAKEMOTO D., PARK P., SCOTT B.: Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial ryegrass mutualistic interaction. *The Plant Cell.*, 2006, **18**, 1052-1066.
163. TEPASKE M., POWELL R.: Analyses of selected endophyte-infected grasses for the presence of loline-type and ergot-type alkaloids. *J. Agric. Food Chem.*, 1993, **41**, 2299-2303.
164. TOR-AGBIDYE J., BLYTHE L., CRAIG A.: Correlation of endophyte toxins (ergovaline and lolitrem B) with clinical disease: fescue foot and perennial ryegrass staggers. *Vet. Hum. Toxicol.*, 2001, **43**, 140-146.
165. VIEDEMANN B., BONY S., BERNY P.: Determination of ergovaline in endophyted seeds by high performance thin layer chromatography (HPTLC). *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 2000, **23**, 2727-273.
166. VILA-AIUB M., GUNDEL P., GHERSA C.: Fungal endophyte infection changes growth attributes in *Lolium multiflorum* Lam. *Austral Ecology*, 2005, **30**, 49-57.
167. VISENTIN I., MONTIS V., DÖLL K., ALABOUVETTE C., TAMIETTI G., KARLOVSKY P., CARDINALE F.: Transcription of genes in the biosynthetic pathway for fumonisin mycotoxins is epigenetically and differentially regulated in the fungal maize pathogen *Fusarium verticillioides*. *Eukaryot. Cell*, 2012, **11**, 252-259.
168. WÄLI P., HELANDER M., NISSINEN O., SAIKKONEN K.: Susceptibility of endophyte -infected grasses to winter pathogens (snow molds). *Can. J. Botany*, 2006, **84**, 1043-1051.
169. WALZEL B., RIEDERER B., KELLER U.: Mechanism of alkaloid cyclopeptide synthesis in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Chem. Biol.*, 1997, **4**, 223-230.
170. WHITE J., MORGAN-JONES G., MORROW A.: Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 1993, **44**, 13-37.

171. WHITE J. Jr., MARTIN T., CABRAL D.: Endophyte-host associations in grasses. XXII. Conidia formation by *Acremonium* endophytes on the phylloplanes of *Agrostis hiemalis* and *Poa rigidifolia*. *Mycologia*, 1996, **88**, 174-178.
172. WHITE J. Jr., SULLIVAN R., BALADY G., GIANFAGNA T., YUE Q., MEYER W., CABRAL D.: A fungal endosymbiont of the grass *Bromus setifolius*: Distribution in some Andean populations, identification, and examination of beneficial properties. *Symbiosis*, 2001, **31**, 241-257.
173. YATES S., PETROSKI R., POWELL R.: Analysis of loline alkaloids in endophyte-infected tall fescue by capillary gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 1990, **38**, 182-185.
174. YOUNG C., BRYANT M., CHRISTENSEN M., TAPPER B., BRYAN G., SCOTT B.: Molecular cloning and genetic analysis of a symbiosis-expressed gene cluster for lolitrem biosynthesis from a mutualistic endophyte of perennial ryegrass. *Mol. Gen. Genomics*, 2005, **274**, 13-29.
175. YOUNG C., FELITTI S., SHIELDS K., SPANGENBERG G., JOHNSON R., BRYAN G., SAIKIA S., SCOTT B.: A complex gene cluster for indole-diterpene biosynthesis in the grass endophyte *Neotyphodium lolii*. *Fungal Genet. Biol.*, 2006, **43**, 679-693.
176. YOUNG C., TAPPER B., MAY K., MOON C., SCHARDL C., SCOTT B.: Indole-diterpene biosynthetic capability of *Epichloë* endophytes as predicted by *ltm* gene analysis. *Appl. Environ. Microb.*, 2009, **75**, 2200-2211.
177. YUE Q., MILLER C., WHITE J. Jr., RICHARDSON M.: Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloë festucae*. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 4687-4692.
178. ZHANG D-X., STROMBERG A., SPIERING M., SCHARDL C.: Coregulated expression of loline alkaloid-biosynthesis genes in *Neotyphodium uncinatum* cultures. *Fungal Genet. Biol.*, 2009, **46**, 517-530.
179. ZHANG D-X., NAGABHYRU P., BLANKENSHIP J., SCHARDL C.: Are loline alkaloid levels regulated in grass endophytes by gene expression or substrate availability? *Plant Signaling & Behavior*, 2010, **5**, 1419-1422.
180. ZHANG X., LI C., NAN Z., MATTHEW C.: *Neotyphodium* endophyte increases *Achnatherum inebrians* (drunken horse grass) resistance to herbivores and seed predators. *Weed Res.*, 2011, **52**, 70-78.

CHAPITRE 2

Etudes sur Fétuque élevée



Présentation de l'article 2

L'association symbiotique entre fétuque élevée (*Lolium arundinaceum*, FE) et *Epichloë coenophiala* (anciennement *Neotyphodium coenophialum*, Leuchtman et al., 2014) permettant à la plante de résister à certains stress biotiques ou abiotiques conduit également à la production d'ergovaline (EV), toxique pour le bétail. De nombreux cas de « fescue toxicosis » ont ainsi été observés aux Etats-Unis, Nouvelle-Zélande et Australie alors que très peu de cas sont répertoriés en France. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences comme une faible capacité des FE sauvages à produire de l'EV, des conditions de croissance végétale défavorables ou encore des facteurs liés à l'animal et à son lieu d'élevage (refus de consommer de l'aliment endophyté ou meilleure résistance aux toxines...). L'objectif de cet article est de présenter différents facteurs à l'origine de la production d'EV dans la plante hôte. Pour cela **deux études** ont été menées en parallèle au cours de ma thèse :

☞ La première visait à estimer les niveaux de production en EV par des FE endophytées sauvages récoltées dans le Sud Ouest de la France. En effet aucune donnée française n'était disponible concernant les teneurs en EV et par conséquent les risques potentiels (seuils toxiques) pour les animaux consommant des FE sauvages. Cette étude n'avait pas pour objectif de faire une description exhaustive du nombre de souches d'endophytes potentiellement toxigène mais plutôt d'évaluer si ces souches sauvages sont de fortes productrices d'EV.

☞ La deuxième a été conduite à Saint-Affrique (Aveyron) suite aux premiers résultats obtenus en 2010 lors de l'essai *in vivo* « ovins laitiers ». Le fourrage utilisé dans cet essai était composé d'une variété de FE appelée Kentucky 31 fréquemment utilisée dans les essais toxicologiques et à l'origine de nombreux cas d'intoxications aux Etats-Unis. En 2010, les doses réputées toxiques n'ont pas été atteintes et aucune brebis n'a présenté de signe d'intoxication. Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce résultat :

- i) Le protocole de distribution de l'herbe, après fauche à 8cm, aurait laissé au champ les parties toxiques (la fauche avait été réalisée à 8 cm, hauteur classique, toutefois, les effets toxiques observés au champ suggèrent une coupe rase de l'herbe par les animaux qui pâturent). Cette hypothèse nous a conduit à nous demander qu'elle était la répartition de l'EV dans les différentes parties consommable de la plante.
- ii) Les accidents liés à la consommation de FE endophytée étant saisonniers (le « Summer syndrome » en été et la « Fescue foot disease » en hiver), la période de l'année pendant

laquelle a eu lieu cet essai n'était peut-être pas idéale. Cette constatation nous a conduits à analyser la variabilité saisonnière de production d'EV.

Par ailleurs, certains facteurs abiotiques comme la lumière, la température, la disponibilité en eau influencent la croissance végétale mais également la synthèse de toxines (article 1, paragraphe « Facteurs extrinsèques », p.30). Nous avons donc profité des analyses précédentes pour rechercher la présence de corrélations entre certains facteurs agro-environnementaux, comme le cumul de pluies et de températures, et la teneur en EV ?

Pour la première étude concernant les niveaux de production en EV dans les FE endophytées sauvages, 166 plants de FE ont été récoltés en 2009 sur 26 sites répartis sur 6 départements du Sud Ouest : Aveyron, Gard, Haute-Garonne, Gers, Hérault et Pyrénées Orientales (coordonnées GPS confidentielles). Les plantes détectées comme endophytées ont été mises en culture en station expérimentale (Druelle, Aveyron) afin de réaliser un dosage en EV sur les grains et ainsi s'affranchir de l'impact du stade de développement de la plante le jour de la collecte sur cette teneur. Après un an de culture environ 5 g de graines ont été collectés par échantillon puis séchés et broyés. Les concentrations en EV ont été déterminées par HPLC avec un détecteur à fluorescence (Rottinghaus et al., 1991). Le pourcentage d'extraction était de $83 \pm 4\%$ et la limite de quantification de $20 \mu\text{g EV/kg}$ matière sèche (MS).

Soixante pourcent des plantes collectées étaient infectées avec *E. coenophiala*. Ce résultat est cohérent avec la seule étude française concernant les FE sauvages dans le centre de la France (65% étaient endophytées) et les différents travaux européens (entre 7 et 100% d'endophytisme selon les pays) (Clement et al., 2001 ; Guillaumin et al., 2001 ; Takach et al., 2012). Tous les échantillons analysés contenaient de fortes teneurs en EV, en moyenne $14826 \pm 7292 \mu\text{g EV/kg MS}$, allant de 3099 à $29282 \mu\text{g EV/kg MS}$ (article 2, figure 2, p.49). Ces teneurs en EV obtenues sur des FE endophytées sauvages sont supérieures à celles décrites dans une étude concernant 25 géotypes de Kentucky 31, cultivar de FE connu pour provoquer de nombreux cas de « fescue toxicosis ». En effet ces derniers contenaient entre 1,1 et $8,7 \text{ mg EV/kg MS}$ (Welty et al., 1994).

Bien que cette étude ne soit pas une étude d'exposition animale à la FE endophytée sauvage, elle a permis de mettre en évidence que les niveaux de production d'EV dans le Sud Ouest de la France par des variétés sauvages de FE sont potentiellement élevés, et que le risque d'intoxication du bétail est bien réel. Cependant, comme cela a été précédemment rappelé, les conditions environnementales de croissance d'une

plante endophytée peuvent influencer la production de mycotoxines (article 1, paragraphe « Facteurs extrinsèques », p.30). Une deuxième étude a donc été mise en place pour analyser les conditions de production d'EV au champ dans les conditions de pratiques agricoles du Sud Ouest de la France.

En septembre 2009, une parcelle de FE endophytée (cultivar Kentucky 31, endophyté à 70% par *E. coenophiala*) a été semée à St Affrique (Aveyron). Elle a été suivie d'avril 2010 à juin 2012. Cent vingt unités N/ha ont été apportées au printemps 2011. La pluviosité et les températures minimales et maximales quotidiennes ont été enregistrées par les stations météorologiques les plus proches. Ces données ont été utilisées pour calculer les sommes des degrés-jours et des précipitations à partir du 1/02 de chaque année.

Les prélèvements de plante étaient hebdomadaires pendant la période de croissance végétale (printemps) et mensuels ou bimensuels en dehors de cette période (été, automne, hiver). A chaque échantillonnage la plante entière a été collectée (sans les racines). A partir du stade épiaison jusqu'à la maturation complète de la graine (échelle Biologische Bundesanstalt Bundessortenamt und Chemische Industrie, échelle décimale servant à la codification des stades phénologiques des mono- et dicotylédones ; Hess et al., 1997) trois prélèvements supplémentaires ont été effectués : l'épi, les feuilles (limbes + tiges) et la base de la plante (gainés foliaires + tiges) (Figure 1).

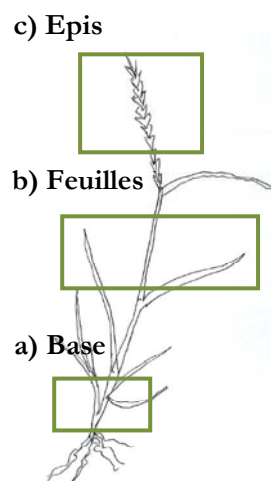


Figure 1 : Prélèvements des différentes parties de la plante : a) base (≈ 5 cm), b) feuilles et c) épis (inflorescence)

Pour chaque type d'échantillon au moins 100g de matière fraîche (correspondant à plusieurs individus) ont été récoltés en 5 points **représentatifs de la parcelle** (minimum 500g au total) (Figure 2) puis séchés et broyés. Le dosage de l'EV a été effectué comme décrit dans la précédente étude (Rottinghaus et al., 1991).



Figure 2 : Points de prélèvements sur la parcelle à St-Affrique

Le suivi des teneurs en EV dans la plante entière durant ces 3 années a mis en évidence que le maximum de production a toujours été obtenu en juin au stade « maturation complète de la graine » (stade 89 échelle BBCH) (article 2, figure 3, p.52). Les teneurs variaient de 330 en 2010 à 879 μg EV/kg MS en 2011. Deux autres pics de concentrations ont également été observés en septembre 2011 (repousse d'automne) et en janvier 2012 (sénescence de la plante). Les pics de production observés au cours de notre étude sont comparables à ceux obtenus dans d'autres pays comme les Etats-Unis, l'Australie (Belesky et al., 1998 ; Lyons et al., 1986)... Les concentrations susceptibles de provoquer des symptômes de « fescue toxicosis » (300 μg EV/kg MS et plus) ont été observées à la fin du printemps, au début de l'automne et pendant un hiver doux. Les variations les plus importantes en EV ont eu lieu après le début de l'épiaison. Les analyses des différentes parties de la plante montrent que les teneurs les plus élevées en EV ont toujours été mesurées dans les épis (article 2, tableau 1, p.53). Variant entre 1406 en 2011 et 1861 μg EV/kg MS en 2012, ces concentrations maximales sont obtenues à maturation complète des graines (stade 89 échelle BBCH). Ces résultats sont en accord avec de précédentes études ayant mis en évidence que cette mycotoxine s'accumulait dans les graines durant leur formation (Rottinghaus et al., 1991 ; Roylance et al., 1994). **Ces analyses ont révélé que la maturité de la plante était un facteur biotique clé dans les variations de teneurs en EV dans la FE.** Les résultats obtenus dans les bases et les feuilles ont néanmoins montré que la vitesse d'accumulation et les quantités cumulées en EV dans ces parties étaient toujours plus élevées en 2011 qu'en 2012. Les différences de productions obtenues sur plante

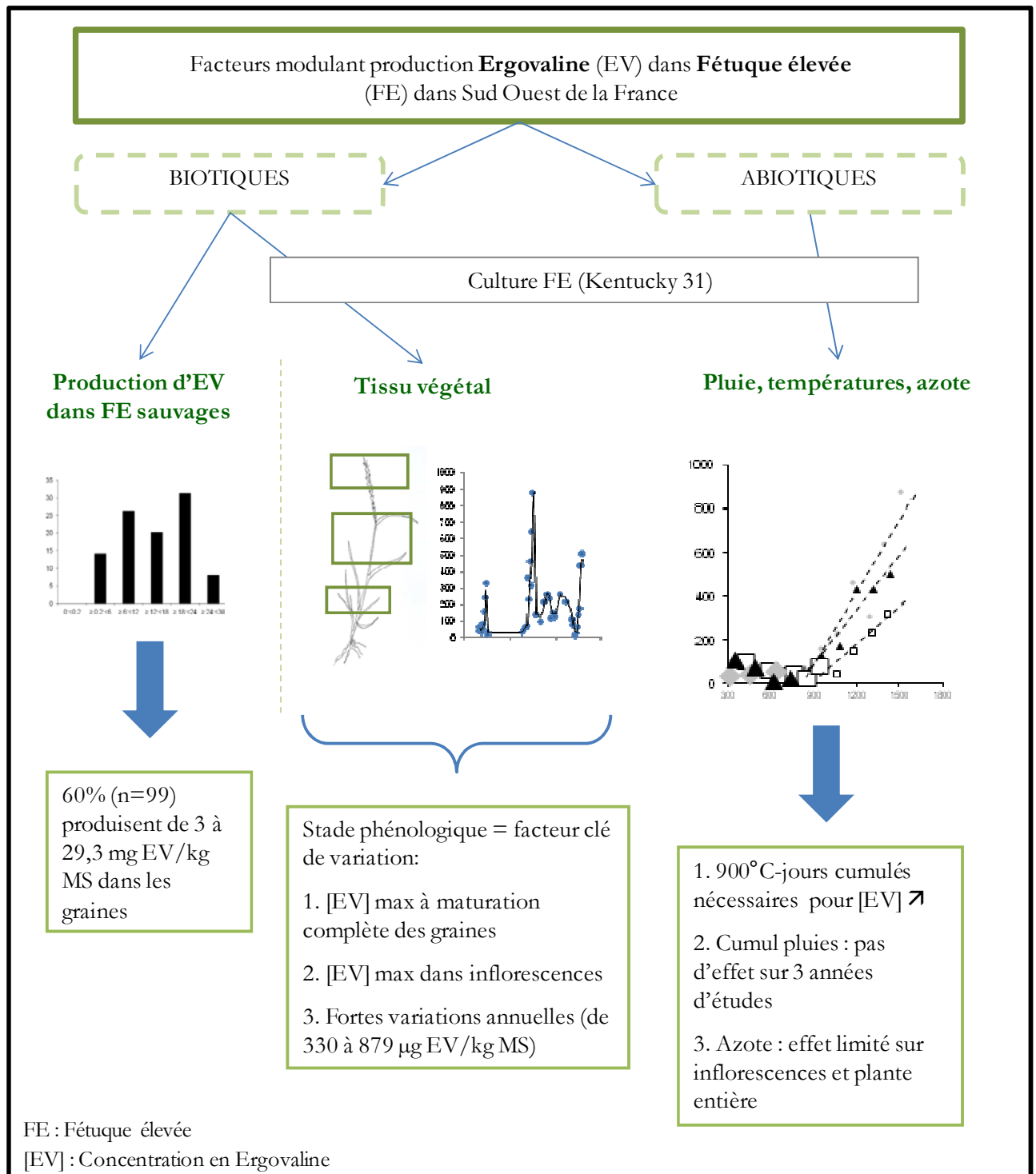
entière, bases et feuilles d'une année sur l'autre pourraient s'expliquer par plusieurs facteurs abiotiques comme les apports azotés, la température ou la pluviosité.

Ces trois facteurs de variation ont été étudiés durant les 3 années de cet essai. Après l'apport azoté de 2011, effectué selon la conduite classique de prairie temporaire française, une rapide augmentation des teneurs en EV a été observée dans les bases et les feuilles. Les concentrations en EV dans la plante entière ne sont pas significativement différentes entre 2011 et 2012. **Cela suggère que la fertilisation azotée a seulement un léger effet sur l'accumulation de la toxine.** Ce résultat est en accord avec des données obtenues par deux études américaines (Lyons et al., 1986 ; Rottinghaus et al., 1991). L'influence de la température à travers le cumul des degrés-jours a également été analysée. Les résultats obtenus ont montré que la concentration en EV augmente de façon linéaire dans la plante entière lorsque **la somme des températures atteint 900°C** (article 2, figure 4, p.53). L'accumulation de la toxine dans la plante dépend du cumul des températures mais elle est indépendante de l'année de production. **Cela suggère que cette corrélation observée est liée à l'effet de la température sur la croissance de la plante.** Par ailleurs il faut souligner qu'un cumul de températures compris entre 1100 et 1300°C est nécessaire pour des teneurs supérieures à 300 µg EV/kg MS. L'effet des précipitations via le cumul des pluies a également été testé. Chaque année une corrélation linéaire entre cumul de précipitations et teneurs en EV a été observée (article 2, figure 4, p.50). Malgré le fait que les pluies de 2011 sont significativement inférieures à celles des autres années aucun effet des précipitations n'a été mis en évidence quelques soit l'année observée. **Ce dernier résultat semble donc aller à l'encontre de ce qui est communément admis, à savoir qu'un déficit hydrique accroît la production d'EV. Il convient toutefois de noter que très peu d'études sont disponibles au champ et que l'intensité du déficit hydrique est très rarement analysée. Il n'est donc pas impossible que dans cette étude, bien que fortement variables, les niveaux de précipitations n'aient pas été suffisamment différents pour entraîner un effet sur les concentrations en EV.**

En conclusion 60% des FE sauvages du Sud Ouest de la France sont endophytées et la plupart sont capables de présenter des teneurs en EV très élevées dans les graines. La culture en plein champ d'une variété réputée toxigène (Kentucky 31) a révélé que les conditions agro-environnementales de l'essai permettent la production de teneurs en toxine équivalentes à celles mesurées dans des pays rapportant des cas d'intoxication à l'EV. L'analyse de différents facteurs de variation a mis en évidence que les concentrations en EV dans la plante étaient

principalement liées au degré de maturation de la graminée hôte. **Trois périodes à risque ont été identifiées : la fin du printemps, le début de l'automne et les hivers doux.** Cette étude a également révélé que seule la température à travers le cumul des degrés-jours avait une réelle influence sur les teneurs en EV dans la plante, principalement à travers son effet sur la croissance du végétal. **Ces différents résultats n'expliquent donc pas l'absence de cas d'intoxication d'animaux pâturant des prairies naturelles contenant de la FE endophytée dans le Sud Ouest de la France.**

Encadré 3 : Etude des facteurs modulant la production d'Ergovaline dans la Fétuque élevée



Article 2

Endophyte Infection of Tall Fescue and the Impact of Climatic Factors on Ergovaline Concentrations in Field Crops Cultivated in Southern France.

Repussard C., Zbib N., Tardieu D., and Guerre P.

Université de Toulouse, INP, ENVT, UR Mycotoxicologie, F-31076 Toulouse, France

Mots clés

Tall fescue (*Lolium arrundinaceum*), fungal endophyte (*Epicloë coenophiala*), Kentucky-31, ergovaline, climatic factors, BBCH scale, temperatures, pluviometry

Article publié en 2014 dans Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 62 (39), 9609-9614.

Endophyte Infection of Tall Fescue and the Impact of Climatic Factors on Ergovaline Concentrations in Field Crops Cultivated in Southern France

Céline Repussard, Nasrallah Zbib, Didier Tardieu, and Philippe Guerre*

INP, ENVT, UR Mycotoxicologie, Université de Toulouse, F-31076 Toulouse, France

ABSTRACT: Tall fescue (*Lolium arundinaceum*) infected by *Epichloe coenophiala* contains ergot alkaloids responsible for fescue toxicosis in Australia, New Zealand, and the United States, with only a few cases occurring in Europe. The detection of *Epichloe* in 166 *L. arundinaceum* collected in southern France revealed that 60% were infected, 51% being high ergovaline producers. The ergovaline level in endophyte-infected tall fescue Kentucky 31 was monitored during 3 years in various parts of the plant. Maturation of plants, recorded according to the BBCH scale, appeared to be the main factor for estimating the risk of toxicity. Ergovaline levels of ≥ 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dry matter were obtained at the end of spring, the beginning of autumn, and mid-winter. Positive correlation between ergovaline level and cumulative degree-d was observed, whereas rainfall had no effect. These results suggest that the lack of fescue toxicosis observed in France cannot be explained by the lack of ergovaline in tall fescue.

KEYWORDS: tall fescue (*Lolium arundinaceum*), fungal endophyte (*Epichloe coenophiala*), Kentucky 31, ergovaline, climatic factors, BBCH scale, temperatures, pluviometry

INTRODUCTION

Epichloe coenophiala is an endophytic fungus that lives in symbiosis with tall fescue (*Lolium arundinaceum*).^{1–3} It is generally accepted that tall fescue and the endophyte share a natural symbiotic relationship.⁴ However, this association is responsible for the production of compounds that are toxic to livestock.^{5,6} Ergovaline has been recognized as the main ergopeptine alkaloid produced in tall fescue^{7,8} and is considered to be responsible for fescue toxicosis in livestock.⁹ Two main diseases were distinguished on the basis of visible symptoms and on the period of the year they were observed. “Fescue foot toxicosis”, which was characterized by necrosis of the extremities, occurred in winter, whereas the “summer syndrome”, which was characterized by a decrease in growth, was observed in summer. Both diseases have been described in sheep and cattle, the latter being the most sensitive.¹⁰ To avoid toxic problems, grass/endophyte associations have been developed with nontoxic strains of *Epichloe* for tall fescue in the field.^{11,12} Surprisingly, although endophyte-infected tall fescues are found in natural grasslands on all continents, cases of toxicities are mainly reported in Australia, New Zealand, and the United States.¹³ In Europe, only a few cases of toxicity have been reported.¹⁴ Several factors could explain these differences. Tall fescue is a dominant forage crop in Australia, New Zealand, and the United States, whereas mixtures of species are often used to sow pastures in France. It has been estimated that >90% of tall fescue pastures in the United States are infected with *E. coenophiala*.^{15,16} By contrast, the rate of infection of tall fescue in Europe varies considerably with the country and ranges from 7% in mainland Greece to 100% in Sardinia, with intermediary results (63%) in France.^{2,17,18} Although major differences have been observed between infected fescues in producing ergovaline,² information concerning the ability of the isolates to produce the toxin is not always available. Several biotic and abiotic factors have been shown to modulate alkaloid

levels in the plant. Not only the genotype of endophyte-infected tall fescue but also the year of analysis appears to have an effect on ergovaline concentrations in both the whole plant and the seeds.^{8,19–21} Nitrogen fertilization has been reported to increase the concentration of ergovaline,^{7,20,22} and a low water supply or high temperatures are thought to increase alkaloid production.²³ Moreover, the maturity of the plant strongly influences the level of ergovaline, the presence of head seeds being an important factor.²⁰

Finally, several hypotheses could explain the absence of fescue toxicosis in Europe despite the presence of *E. coenophiala*: (i) low rate of infection of wild fescue by *E. coenophiala*; (ii) lack of ability of *E. coenophiala* to produce ergovaline; (iii) low production of ergovaline in plants because of the growing conditions; (iv) factors linked to animal species and farming conditions (including low exposure, refusal of feed that contains infected material, and higher resistance to the toxins). The purpose of this study was to investigate factors linked to tall fescue infection and ergovaline production.

MATERIALS AND METHODS

Plant Collection. A total of 166 *L. arundinaceum* plants were collected at 26 sites (5–12 per site) in southern France in June 2009. The plants were potted and screened for the presence of *Epichloe* using a Phytoscreen immunoblot kit according to the manufacturer's instructions (Agrinostics Ltd., Watkinsville, GA, USA). Plants were grown outside for one year at the Rouergue Auvergne Gévaudan Tarnais (RAGT) experimental station in Druelle (Aveyron, France) with no complementary inputs of water or fertilizer. At the fully ripe stage, around 5 g of seeds was collected from the endophyte-infected

Received: June 27, 2014

Revised: September 2, 2014

Accepted: September 5, 2014

Published: September 5, 2014

fescues, dried, and ground as described below for ergovaline determination.

Experimental Pastures. A 0.75 ha plot was sown in September 2009 in Saint-Affrique (Aveyron, France) with an endophyte-infected tall fescue (*L. arundinaceum*, Kentucky 31 E+, infection rate of 94% measured on seedling) provided by RAGT 2n SAS (Rodez, France). Seeds (27 kg seeds/ha) were sown after conventional soil preparation (plowing and harrowing). Plant growth was monitored weekly according to the scale provided by the Biologische Bundesanstalt Bundessortenamt and Chemische Industrie (BBCH scale).²⁴ The plot was mowed each year at the fully ripe stage (stage 89 on the BBCH scale): June 18, 2010; June 10, 2011; June 19, 2012. In 2011, 120 units of nitrogen per hectare was added in the form of urea on the plot: 70 U/ha on March 9, 2011, and 50 U/ha on April 13, 2011. Rainfall events were recorded with a pluviometer at the Saint-Affrique site, and temperatures were taken daily at the Montlaur meteorological station located 9 km from Saint-Affrique. Effects of temperature were estimated by calculating cumulative degree-d from the beginning of February.^{25,26}

Plant Material. The concentration of ergovaline in fescue cultivated in the experimental pastures was monitored from April 2010 to June 2012. During the growing season (spring), plants were sampled weekly, whereas outside this period (summer, fall, winter), plants were sampled once or twice a month. At each sampling date, the whole plants were cut just above the ground. From the heading stage (stage 51 on the BBCH scale) to the fully ripe stage (stage 89 on the BBCH scale) three other parts of the plant were collected: inflorescence (after the heading stage), leaves (stem and leaf blade), and base (stem and leaf sheath). On each occasion around 100 g of fresh material was harvested in five different representative areas of each plot. All of the samples were placed in a ventilated ULE 500 oven (Memmert, Schwabach, Germany) for 24 h at 60 °C. One hundred grams of oven-dried sample was then ground to 0.5 mm with a Cyclotech 1093 mill (Foss, Hogande, Sweden) and then stored at room temperature until analysis.

Chemical Analysis of Ergovaline. The ergovaline standard was kindly provided by G. E. Rottinghaus (College of Veterinary Medicine, University of Missouri, USA). All reagents and chemicals were of HPLC grade and were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Ergovaline concentrations in the samples were determined by HPLC by fluorescence detection according to the method of Rottinghaus et al.²⁰ with slight modifications. Five grams of oven-dried milled grass was extracted with 100 mL of chloroform and 5 mL of 0.1 M sodium hydroxide for 2 h on an orbital shaker. Extracts were filtered on IPS-Whatman phase separators and purified through a homemade column prepared as follows: 1 cm of Ergosil silica gel (Analtech Inc., Newark, DE, USA) was placed in a 5 mL empty SPE cartridge (Silicycle, Quebec, Canada) followed by a biological disk (Silicycle, Quebec, Canada) and 1 cm of sodium sulfate. Columns were preconditioned with 2 mL of dichloromethane, and 10 mL of the extract was then passed through the columns. The extract was eluted with 3 mL of methanol and dried under nitrogen. The dried extract was suspended in 500 μ L of methanol, and 20 μ L was injected in the HPLC system. Separation was achieved with acetonitrile (35%) in aqueous ammonium carbonate (200 mg/L, 65%) through a 150 \times 4.6 mm, 5 μ m, 120 Å Prontosil C18 column (Bischoff Chromatography, Leonberg, Germany). Ergovaline was detected by fluorescence with excitation and emission wavelengths of 250 and 420 nm, respectively. The retention time was 9.4 min. The percentage of recovery was 83 \pm 4%. The limit of quantitation was 20 μ g ergovaline/kg DM. Samples with ergovaline levels >500 μ g/kg DM were diluted before new analysis.

Statistical Analysis. Statistical analysis was performed using R version 2.11.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Distribution of ergovaline concentration in seeds was assessed by using the Shapiro test. The ergovaline levels in the plant were compared by year using one-way ANOVA. The slopes of ergovaline concentration in whole plant, base, leaves, and inflorescence plotted according to the stage of maturation were compared using ANCOVA. The effects of the year (factor 1) and cumulative

temperature or cumulative rainfall (factor 2) on ergovaline concentration were evaluated using two-way ANOVA. The *P* values obtained at each analysis are reported in results. Results were considered different with a *P* value below 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

Since the discovery of ergovaline and its vasoactive properties, most cases of fescue toxicosis have been linked to the presence of this toxin in the plant, and a range of toxic levels has been established. In cattle, threshold levels of approximately 300–400 μ g ergovaline/kg DM have been proposed, higher concentrations of ergovaline in feed and cold temperatures being required to develop necrosis of the extremities.^{5,10,27,28} Studies on endophyte-infected fescue in several countries demonstrated the presence of ergovaline at relatively high concentrations, which could explain the cases of toxicity observed in Australia, New Zealand, and the United States.^{5,14,19,20} In Europe, although tall fescue is infected with *E. coenophiala*, only a few data are available on the ergovaline concentration and its factors of variation. Ergovaline (Figure 1) concentrations in seeds and plants were monitored by

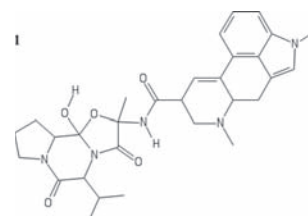


Figure 1. Structure of ergovaline.

fluorescence detection after separation by HPLC that permitted a limit of quantitation of 20 μ g ergovaline/kg DM to be reached.²⁰

Ergovaline Concentrations in Wild Tall Fescue Seeds.

Ninety-nine plants of the 166 we collected (60%) were endophyte-infected according to the Phytoscreen immunoblot kit. The level of E+ in the populations collected ranged from 0 to 100%, depending on the point of collection. This rate of infection is consistent with that obtained in a study conducted in central France, where 65% infection was reported.¹⁸ It is within the range of infection reported in Europe, 7% infection being observed in mainland Greece and 100% in Sardinia.^{2,17} Figure 2 shows the concentrations of ergovaline in the seeds obtained after 1 year of growth outside without complementary water or fertilizer inputs. All of the endophyte-infected seeds analyzed had ergovaline concentrations higher than the limit of quantitation, the lowest and highest concentrations being 3.1 and 29.3 mg ergovaline/kg DM, respectively. The distribution of ergovaline in the seeds did not follow a normal distribution (Shapiro test, *P* = 0.003). The mean \pm SD and the median were 14.8 \pm 7.3 and 15.5 mg ergovaline/kg DM, respectively. The ergovaline concentration of the endophyte-infected fescue seeds of Kentucky 31 sown in the experimental pastures was 6.0 mg ergovaline/kg DM. This value is among the highest reported in 25 genotypes of Kentucky 31 tall fescue seeds with high endophyte infection; levels usually range from 1.1–4.8 to 2.0–8.0 mg ergovaline/kg DM, depending on the year of analysis and the country.^{8,19} Therefore, 86% of the wild endophyte-infected fescue seeds collected in southern France had higher concentrations of ergovaline than the Kentucky 31 endophyte-infected fescue seeds.

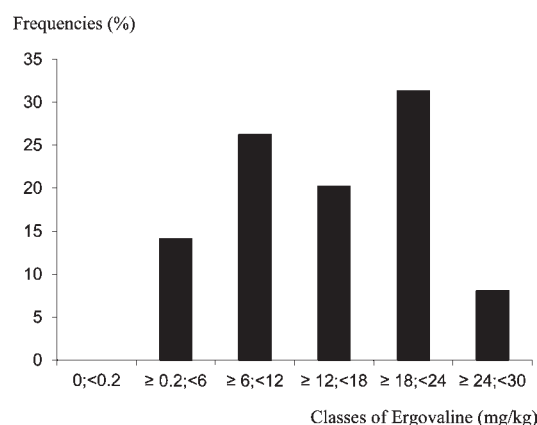


Figure 2. Repartition of the concentrations in ergovaline in endophyte-infected tall fescue seeds collected in southern France ($n = 99$).

Ergovaline Concentration in Plants. Because ergovaline production in plants varies with biotic (endophyte strain) and abiotic factors, as well as with the part of the plant analyzed, seeds of endophyte-infected Kentucky 31 were sown in field conditions to monitor the ergovaline concentration in tall fescue under French agricultural conditions. The level of ergovaline in the plant has been reported to vary with the genotype of endophyte-infected tall fescue.^{19,29,30} This cultivar was selected because no endophyte-infected tall fescue was commercialized in France and because data on ergovaline levels are available for comparison in other countries. Figure 3 shows the levels of ergovaline in the endophyte-infected tall fescue Kentucky 31 as a function of the sampling period. Each year, the ergovaline concentration increased from the heading stage

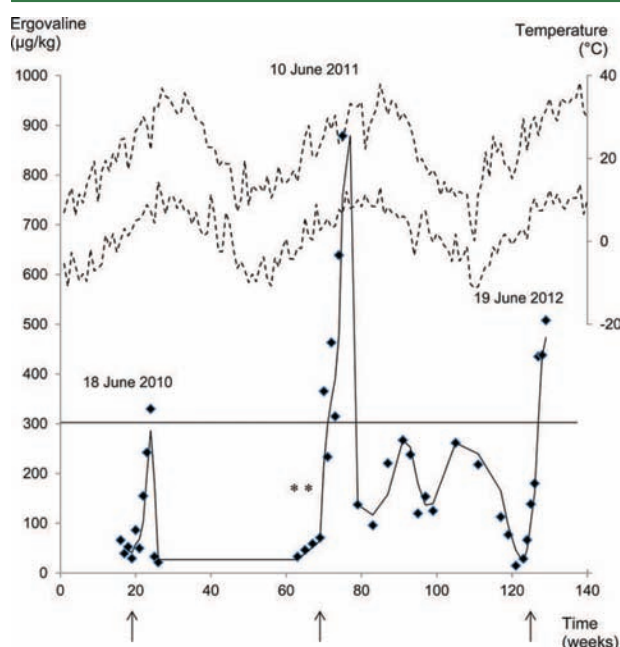


Figure 3. Ergovaline concentration in the whole endophyte-infected tall fescue Kentucky 31 plant sown in September 2009 in Saint-Affrique (Aveyron, France): (↑) beginning of heading; (*) fertilization; (—) toxic threshold level; (---) minimum and maximum temperatures. Week 1 is the first week in 2010.

(end of April) to reach its maximum level 6 weeks later, at the fully ripe stage. This result agrees with previous data obtained in field conditions and in studies demonstrating that ergovaline accumulates in the seed during its formation.^{20,21} Although the maximum levels were always in June (June 18, 2010; June 10, 2011; and June 19, 2012) the concentrations of ergovaline in the plants varied considerably with the year: from 330 μg ergovaline/kg DM in 2010 to 879 μg ergovaline/kg DM in 2011. The greatest variations in ergovaline concentrations in the whole plant occurred after the beginning of heading (weeks 20, 70, and 124), when the inflorescences emerged (Figure 3). Before emergence of the inflorescence, mean ergovaline concentrations in the whole plants were 47, 52, and 58 μg /kg DM for the years 2010, 2011, and 2012, respectively. No significant difference was observed between years (ANOVA), and the mean concentration was 53 ± 27 μg ergovaline/kg DM. From emergence of the inflorescence to the fully ripe stage, the concentration of ergovaline in the whole plant was significantly lower in 2010 than in 2011 and 2012 (ANCOVA, $P = 0.045$ and 0.049 , respectively), whereas the difference between the years 2011 and 2012 was not significant. Two other ergovaline peaks were observed, one in September 2011 (weeks 91–93) and another in January 2012 (weeks 105–111). The fall peak corresponded to plant regrowth (“regain”), at the same time as an increase in ergovaline production in planta, and has been previously reported.²¹ By contrast, the winter peak is probably linked to the accumulation of ergovaline in the plant that occurs during senescence. High ergovaline has already been reported in leaves in winter.⁷ The presence of high levels of ergovaline in the whole plant in winter is of interest because fescue foot disease occurs in winter, even if other factors such as external temperature are involved in the severity of the lesions.³¹ Of these three periods, the levels of ergovaline in whole plant were low, in agreement with data obtained in Kentucky 31 tall fescue in Columbia, MO, USA.²⁰

Table 1 lists the concentrations of ergovaline measured in the base, leaves, and inflorescence from the heading stage to the fully ripe stage in 2011 and 2012. At the beginning of heading, weeks 69 and 123, the ergovaline concentrations were similar in base, leaves, and inflorescence, but slightly higher in inflorescences in 2011. From 70% of inflorescence emerged to fully ripe, weeks 70–75 and 124–129, the highest level of ergovaline was generally measured in the inflorescence, whereas the concentrations in the base and leaves were lower, except in weeks 70 and 72. Irrespective of the part of the plant analyzed, the ergovaline level obtained at the fully ripe stage did not appear to be correlated with the level at the heading stage. For example, the concentrations of ergovaline in the inflorescences ranged from 57 to 1861 μg /kg DM in 2012 and from 96 to 1406 μg /kg DM in 2011.

A comparison of the slope of ergovaline accumulation in the different parts of the plant showed that accumulation in the leaves varied with the year ($P = 0.031$, ANCOVA), whereas differences in the inflorescence and the bases were not significant. Also, the kinetics of accumulation of ergovaline appeared to vary from year to year. When the inflorescences emerged, weeks 70–71 and 124–125 (Table 1), ergovaline concentrations were markedly higher in bases and leaves in 2011 than in 2012. Later, weeks 72–74 and 126–128, ergovaline concentrations in the bases increased in 2012 to reach values near those measured in 2011, whereas the ergovaline levels in leaves were usually lower in 2012 than in 2011. At the fully ripe stage, weeks 75 and 129 (Table 1), the

Table 1. Ergovaline Concentrations in Endophyte-Infected Tall Fescue (Kentucky 31 E+) from Heading to Fully Ripe ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Dry Matter)^a

stage description	code	2011			2012				
		weeks	B	L	I	weeks	B	L	I
beginning of heading	51	69	44	39	96	123	50	63	57
70% of inflorescence emerged	57	70	305	142	516	124	59	45	166
inflorescence fully emerged	59	71	237	127	272	125	70	70	386
beginning of flowering	61	72	289	304	221	126	192	148	463
end of flowering	69	73	287	248	571	127	479	156	400
late milk	77	74	331	629	1308	128	302	143	537
fully ripe	89	75	535	408	1406	129	216	182	1861

^aB, base; L, leaves; I, inflorescence.

concentration of ergovaline was around 2-fold higher in bases and leaves in 2011 than in 2012, whereas levels in inflorescences were higher in 2012 (1861 and 1406 μg ergovaline/kg DM in 2012 and 2011, respectively). Finally, these results showed that the speed and the level of accumulation of ergovaline in the bases and in the leaves were higher in 2011 than in 2012, whereas no difference was observed for the inflorescences.

Factors of Variation. The relatively wide range of ergovaline concentrations observed in this study depending on the year is in agreement with data obtained in other countries^{19,20} and older reports of toxicosis in cattle.³² The levels obtained at the fully ripe stage agree with the results of studies conducted in 1983 and 1984 in Watskinville, GA, USA, in which maximum mean ergovaline concentrations ranging from 275 to 464 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM were reported depending on the year of analysis and the use of fertilizer.²¹ Likewise, ergovaline concentrations measured in head seeds did not differ markedly from those reported in other studies. In the present study, ergovaline concentrations in inflorescences ranged from 1406 to 1861 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM in 2011 and 2012, respectively, whereas they ranged from 1700 to 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM the 1988 and 1987 in a study conducted in Columbia, MO, USA.²⁰

Fertilizer was added in 2011. The nitrogen input was within the usual recommendations for this kind of pasture.³³ After fertilization, a rapid increase in ergovaline was observed in the bases and leaves, and concentrations in these parts of the plant were around 2-fold higher in 2011 than in 2012 when no fertilizer was added. Although factors other than nitrogen inputs to the pasture could explain these differences, this result agrees with previous data demonstrating an increase in ergovaline concentrations in fertilized plants.²⁰ The levels reached in plants are difficult to compare between studies because ergot alkaloid contents vary with the dose and the kind of fertilizer used.^{7,20} In the present study, fertilization appears to have had no effect on the level of ergovaline in the inflorescence. No difference in ergovaline content in the whole plant was observed between 2011 and 2012, suggesting that fertilization has only a weak effect on the final level of toxin in the forage, the degree of maturation of the plant being the most important factor in terms of risk of toxicosis. This result is in agreement with data obtained in Watskinville, GA, USA, where different effects of nitrogen fertilization on the level of ergovaline in the whole plant were observed depending on the year of the assay.²¹ This result is also in agreement with data showing a lack of correlation between nitrogen and ergovaline concentration in straw.¹⁹

Climatic Factors. Correlations between ergovaline levels in the whole plant and climatic factors were performed to

investigate putative risk factors during the three study years. Concentrations of ergovaline in the whole plant were plotted according to the cumulative degree-d observed each year from the beginning of February to the fully ripe stage (Figure 4A). When cumulative degree-d values were below 900 °C, the mean

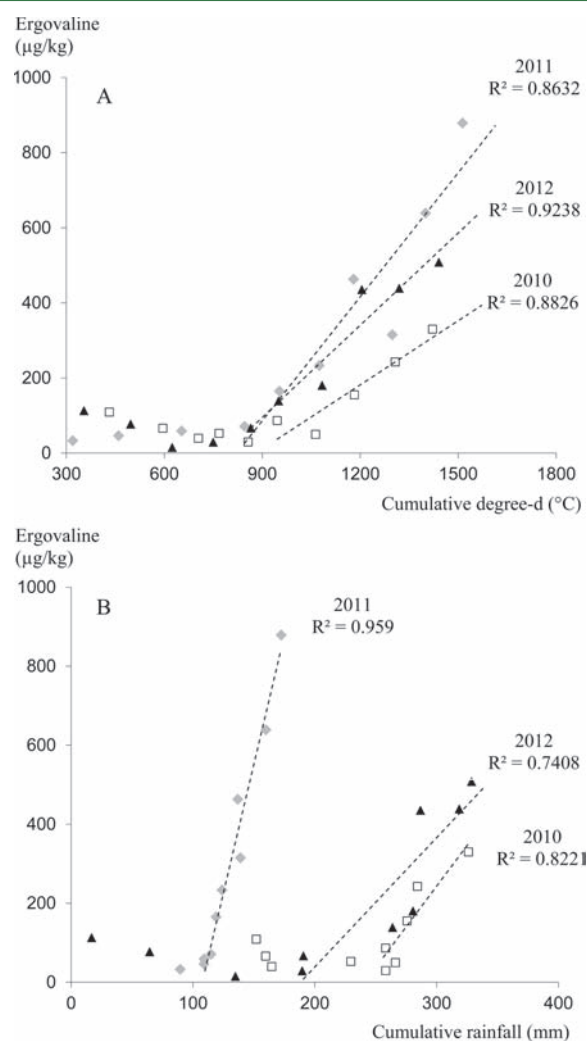


Figure 4. Concentrations of ergovaline in whole endophyte-infected tall fescue Kentucky 31 plants sown in September 2009 in Saint-Affrique (Aveyron, France) plotted according to cumulative degree-d (A) or cumulative rainfall (B) observed each year from the beginning of February to the fully ripe stage.

ergovaline concentration in the whole plant was low and did not differ by year. When cumulative degree-d values were higher than 900 °C, a linear increase of ergovaline in the whole plant was observed, with very high R^2 in each study year. Analysis of the effect of year and temperature on the concentration of ergovaline in the whole plant (two-way ANOVA) revealed a strong effect of cumulative temperature ($P < 0.001$), whereas the effect of year was not significant. However, the day for which the cumulative degree-d of 900 °C was reached varied with the year: May 17, 2010; May 3, 2011; and May 19, 2012 (Figure 5). Interestingly, cumulative degree-

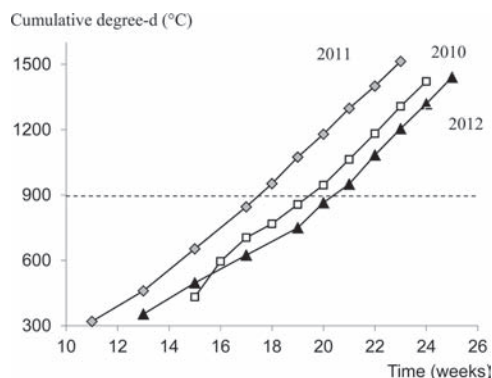


Figure 5. Cumulative degree-days according to the week of the year; (---) level required for having an increase of ergovaline concentration in plants.

d values of around 900 °C were required for the development of inflorescence of tall fescue.²⁵ The fully ripe stage was observed for a cumulative degree-d around 1500 °C (Figure 5). This stage was reached on June 18, 2010; June 10, 2011; and June 19, 2012. Subsequently, ergovaline increased with the increase in cumulative degree-d but with no significant difference between years. This result obtained in the field agrees with data obtained in controlled conditions demonstrating the lack of effect of high temperatures on total ergot contents in tall fescue.³⁴ Finally, this suggests that, during this assay, the correlation observed between ergovaline content in the whole plant and cumulative degree-d is due to an effect of temperature on plant growth.

Cumulative rainfall from the beginning of February to the fully ripe stage plotted against ergovaline concentrations in the whole plant showed major differences between years (Figure 4B). Concerning plant growth, a linear correlation between the concentration of ergovaline and cumulative rainfall was observed in each year. Comparison of rainfall in 2010 and 2012 revealed no significant difference whatever the period analyzed (from February to June or from the emergence of the inflorescence to the fully ripe stage). By contrast, the year 2011 was drier than either 2010 or 2012. However, analysis of the effect of year and cumulative rainfall on the ergovaline concentration in the whole plant (two-way ANOVA) failed to reveal a significant effect of cumulative rainfall ($P = 0.927$) or of the year of analysis ($P = 0.336$). Finally, the concentration of ergovaline in the whole plant was significantly lower in 2010 than in 2011 or 2012, whereas there was no difference in rainfall between 2010 and 2012, and 2011 was the driest year. Although it has been suggested that a limited supply of water could increase alkaloid production,²³ this result in the field agrees with data obtained under controlled conditions,

demonstrating the lack of effect of water availability on total ergot contents in tall fescue.³⁴

In conclusion, this study demonstrates for the first time that around 60% of wild tall fescue is infected with *Epichloe* in southern France and that most of the infected plants are able to produce very high ergovaline levels in seeds. Determination of ergovaline contents in Kentucky 31 tall fescue infected with *E. coenophiala* at different growth stages revealed that the levels in plant can be high and do not markedly differ from levels measured in other countries where fescue toxicosis has been reported. Analysis of the factors of variation of ergovaline concentrations revealed that the maturation of the plant is the main factor that needs to be taken into consideration when the risk of toxicity is estimated. Three peaks of concentration were identified: the end of spring, the beginning of fall, and mid-winter. Accurate estimation of the course of maturation of tall fescue is also recommended for better comparison of data between studies. Although fertilization increased the level of ergovaline in bases and leaves, only slight effects were observed in the whole plant. Cumulative temperature appears to affect the level of ergovaline via its effect on plant growth, whereas cumulative rainfall appears to have no effect on the level of ergovaline under the field conditions in the present study.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(P.G.) E-mail: p.guerre@envt.fr. Fax: +335 61 19 32 40. Phone: +335 61 19 32 17.

Funding

This study was supported by the French government (Fond Unique Interministériel, Project 082906510) and the region Midi-Pyrénées within the framework of a project qualified by the French Competitiveness Cluster AGRIMIP-INNOVATION.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We especially thank Hervé Gryta, Olivier Navaud (EDB, UMR 5174 CNRS-UPS-ENFA, Toulouse, France) and Laurent Hazard (UMR 1248 AGIR, INRA Toulouse, France) for collecting tall fescue samples in 2009 and Faouzi Lyazrhi (UP Biostatistique, INP, ENVT, Toulouse, France) for helpful discussion of the statistical analysis of the results.

ABBREVIATIONS USED

RAGT, Rouergue Auvergne Gévaudan Tarnais; BBCH, Biologische Bundesanstalt Bundessortenamt and Chemische Industrie; DM, dry matter

REFERENCES

- Christensen, M. J.; Leuchtman, A.; Rowan, D. D.; Tapper, B. A. Taxonomy of *Acremonium* endophytes of tall fescue (*Festuca arundinacea*), meadow fescue (*F. pratensis*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Mycol. Res.* **1993**, *97*, 1083–1092.
- Takach, J. E.; Mittal, S.; Swoboda, G. A.; Bright, S. K.; Trammell, M. A.; Hopkins, A. A.; Young, C. A. Genotypic and chemotypic diversity of *Neotyphodium* endophytes in tall fescue from Greece. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 5501–5510.
- Schardl, C. L.; Florea, S.; Pan, J.; Nagabhyru, P.; Bec, S.; Calie, P. J. The epichloae: alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2013**, *16*, 480–488.

- (4) Kuldau, G.; Bacon, C. *Clavicipitaceous* endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biol. Control* **2008**, *46*, 57–71.
- (5) Tor-Agbidye, J.; Blythe, L. L.; Craig, A. M. Correlation of endophyte toxins (ergovaline and lolitrem B) with clinical disease: fescue foot and perennial ryegrass staggers. *Vet. Hum. Toxicol.* **2001**, *43*, 140–146.
- (6) Garner, G. B.; Rottinghaus, G. E.; Cornell, C. N.; Testereci, H. Chemistry of compounds associated with endophyte/grass interaction: ergovaline- and ergopeptide-related alkaloids. *Agric. Ecosyst. Environ.* **1993**, *44*, 65–80.
- (7) Lyons, P. C.; Plattner, R. D.; Bacon, C. W. Occurrence of peptide and clavine ergot alkaloids in tall fescue grass. *Science* **1986**, *232*, 487–489.
- (8) TePaske, M. R.; Powell, R. G.; Clement, S. L. Analyses of selected endophyte-infected grasses for the presence of loline-type and ergot-type alkaloids. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 2299–2303.
- (9) Lane, G. A.; Christensen, M. J.; Miles, C. O. Coevolution of fungal endophytes with grasses: the significance of secondary metabolites. *Microb. Endophytes* **2000**, 341–388.
- (10) Zbib, N.; Repussard, C.; Tardieu, D.; Guerre, P. Toxicité des mycotoxines produites par des champignons endophytes du genre *Neotyphodium*. *Rev. Med. Vet.* **2014**, *165*, 116–135.
- (11) Bouton, J. H.; Latch, G.; Hill, N. S.; Hoveland, C. S.; McCann, M. A.; Watson, R. H.; Parish, J. A.; Hawkins, L. L.; Thompson, F. N. Reinfection of tall fescue cultivars with non-ergot alkaloid-producing endophytes. *Agron. J.* **2002**, *94*, 567–574.
- (12) Hopkins, A. A.; Young, C. A.; Panaccione, D. G.; Simpson, W. R.; Mittal, S.; Bouton, J. H. Agronomic performance and lamb health among several tall fescue novel endophyte combinations in the South-Central USA. *Crop Sci.* **2010**, *50*, 1552–1561.
- (13) Schmidt, S. P.; Osborn, T. G. Effects of endophyte-infected tall fescue on animal performance. *Agric. Ecosyst. Environ.* **1993**, *44*, 233–262.
- (14) Repussard, C.; Zbib, N.; Tardieu, D.; Guerre, P. Les champignons endophytes du genre *Neotyphodium* et leurs toxines: généralités et problématique française. *Rev. Med. Vet.* **2013**, *164*, 583–606.
- (15) Bacon, C. W.; Siegel, M. R. Endophyte parasitism of tall fescue. *J. Prod. Agric.* **1988**, *1*, 45–55.
- (16) Glenn, A. E.; Bacon, C. W.; Price, R.; Hanlin, R. T. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia* **1996**, *88*, 369–383.
- (17) Clement, S. L.; Elberson, L. R.; Youssef, N. N.; Davitt, C. M.; Doss, R. P. Incidence and diversity of fungal endophytes in tall fescue from Morocco, Tunisia, and Sardinia. *Crop Sci.* **2001**, *41*, 570–576.
- (18) Guillaumin, J. J.; Frain, M.; Pichon, N.; Ravel, C. Survey of the fungal endophytes in wild grass species of the Auvergne region (central France). In *Proceedings of the Fourth International Neotyphodium/Grass Interactions Symposium*; Paul, V. H., Dapprich, P. D., Eds.; Fachbereich Agrarwirtschaft: Soest, Germany, 2001; pp 85–92.
- (19) Welty, R. E.; Craig, A. M.; Azevedo, M. D. Variability of ergovaline in seeds and straw and endophyte infection in seeds among endophyte-infected genotypes of tall fescue. *Plant Dis.* **1994**, *78*, 845–849.
- (20) Rottinghaus, G. E.; Garner, G. B.; Cornell, C. N.; Ellis, J. L. HPLC method for quantitating ergovaline in endophyte-infested tall fescue: seasonal variation of ergovaline levels in stems with leaf sheaths, leaf blades, and seed heads. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 112–115.
- (21) Belesky, D. P.; Stuedemann, J. A.; Plattner, R. D.; Wilkinson, S. R. Ergopeptide alkaloids in grazed tall fescue. *Agron. J.* **1988**, *80*, 209–212.
- (22) Arechavaleta, M.; Bacon, C. W.; Plattner, R. D.; Hoveland, C. S.; Radcliffe, D. E. Accumulation of ergopeptide alkaloids in symbiotic tall fescue grown under deficits of soil water and nitrogen fertilizer. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 857–861.
- (23) Schardl, C. L.; Leuchtman, A.; Spiering, M. J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2004**, *55*, 315–340.
- (24) Hess, M.; Barralis, G.; Bleiholder, H.; Buhr, L.; Eggers, T. H.; Hack, H.; Stauss, R. Use of the extended BBCH scale-general for the descriptions of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. *Weed Res.* **1997**, *37*, 433–441.
- (25) Duru, M.; Cruz, P.; Martin, G.; Theau, J. P.; Charron-Moirez, M. H.; Desange, M.; Jouany, C.; Zerourou, A. Herb'sim: un modèle pour raisonner la production et l'utilisation de l'herbe. *Fourrages* **2010**, *201*, 37–46.
- (26) Duru, M.; Cruz, P.; Theau, J. P. Un modèle générique de digestibilité des graminées des prairies semées et permanentes pour raisonner les pratiques agricoles. *Fourrages* **2008**, *193*, 79–102.
- (27) Stamm, M. M.; DelCurto, T.; Horney, M. R.; Brandyberry, S. D.; Barton, R. K. Influence of alkaloid concentration of tall fescue straw on the nutrition, physiology, and subsequent performance of beef steers. *J. Anim. Sci.* **1994**, *72*, 1068–1075.
- (28) Brown, K. R.; Anderson, G. A.; Son, K.; Rentfrow, G.; Bush, L. P.; Klotz, J. L.; Strickland, J. R.; Boling, J. A.; Matthews, J. C. Growing steers grazing high versus low endophyte (*Neotyphodium coenophialum*)-infected tall fescue have reduced serum enzymes, increased hepatic glucogenic enzymes, and reduced liver and carcass mass. *J. Anim. Sci.* **2009**, *87*, 748–760.
- (29) Siegel, M. R.; Bush, L. P. Defensive chemicals in grass-fungal endophyte associations. In *Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions*, 1st ed.; Romeo, J. T., Saunders, J. A., Barbosa, P., Eds.; Springer: New York, 1996; Vol. 30, pp 81–119.
- (30) Najafabadi, A. S.; Mofid, M. R.; Mohammadi, R.; Moghim, S. Quantification of ergovaline using HPLC and mass spectrometry in Iranian *Neotyphodium* infected tall fescue. *Res. Pharm. Sci.* **2010**, *5*, 135–143.
- (31) Bacon, C. W. Toxic endophyte-infected tall fescue and range grasses: historic perspectives. *J. Anim. Sci.* **1995**, *73*, 861–870.
- (32) Jacobson, D. R.; Carr, S. B.; Hatton, R. H.; Buckner, R. C.; Graden, A. P.; Dowden, D. R.; Miller, W. M. Growth, physiological responses, and evidence of toxicity in yearling dairy cattle grazing different grasses. *J. Dairy Sci.* **1970**, *53*, 575–587.
- (33) Protin, P. V.; Corre-Hellou, G.; Naudin, C.; Trochard, R. Impact des pratiques de fertilisation sur la productivité des prairies et mélanges céréales – protéagineux et la qualité du fourrage. *Fourrages* **2009**, *198*, 115–130.
- (34) Brosi, G. B.; McCulley, R. L.; Bush, L. P.; Nelson, J. A.; Classen, A. T.; Norby, R. J. Effects of multiple climate change factors on the tall fescue-fungal endophyte symbiosis: infection frequency and tissue chemistry. *New Phytol.* **2011**, *189*, 797–805.

CHAPITRE 3

Etudes sur Ray grass anglais



Présentation de l'article 3

L'association symbiotique entre le Ray grass anglais (*Lolium perenne*) et *Epichloë festucae* var. *lolii* (anciennement *Neotyphodium lolii*, Leuchtman et al., 2014) peut conduire à la présence d'ergovaline (EV) et de lolitrème B (LB). Le LB est un indole-diterpène responsable de troubles neurologiques connus sous le nom de « Ryegrass staggers » et d'une baisse de la productivité (Zbib et al., 2014).

Cette mycotoxine peut être dosée dans les matrices végétales par des techniques immuno-enzymatiques (ELISA), chromatographie sur couche mince (CCM) et chromatographie liquide haute pression (HPLC) avec détection en fluorescence ou par spectrométrie de masse. Toutes ces méthodes de dosage nécessitent une étape d'extraction en milieu liquide (solvant organique tel que le chloroforme ou le dichlorométhane) suivie ou non d'une étape de purification. Les techniques CCM et ELISA offrent des limites de quantification respectives de 400 à 14000 µg lolitrème B / kg MS (Garthwaite et al., 1994 ; Berny et al., 1997). La méthode HPLC couplée à un détecteur à fluorescence quantifie jusqu'à 50 µg lolitrème B / kg MS (Moyano et al., 2009). Toutefois, la plupart des méthodes actuellement utilisées font appel à une détection par fluorimétrie après séparation par HPLC (Gallagher et al., 1985).

Le travail présenté dans l'article suivant a consisté en des modifications de la méthode de dosage par HPLC avec détection par fluorimétrie portant principalement sur l'extraction du lolitrem B. Le solvant d'extraction (mélange de chloroforme : méthanol, 2 : 1) a été remplacé par du dichlorométhane et le temps d'extraction a été raccourci (2 minutes au lieu de 1 heure). La linéarité, la précision et les limites de quantification (LQ) et de détection (LD) ont été évaluées pour la validation de cette nouvelle méthode sur le foin et les graines. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1 :

Tableau 1 : Critères de validation de la méthode de dosage du lolitrème B

Critères de validation	Standard	Foin	Graines
Linéarité	0 – 0,5 µg/mL (n=9) R ² = 0,9998	50 – 100 µg/kg MS (n=5) R ² = 0,9968	R ² = 0,9986
Répétabilité (n = 10) (CV%)	3,82	3,96	3,88
Reproductibilité (n = 5/j, 6j) (CV%)	4,04	6,94	5,93
Extraction (moyenne ± SD, n = 15) (%)	-	85,9 ± 3,8	59,4 ± 5
Limite quantification (LQ) (µg/kg MS)	-	50	50
Limite détection (LQ) (µg/kg MS)	-	10	10

Cette méthode est simple, rapide, sensible, et elle permet en effet de quantifier des teneurs en LB dans le foin et les graines à des niveaux bien inférieurs aux seuils toxiques (entre 1800 et 2000 µg LB/kg MS, Tor-Agbidye et al., 2001). Elle peut également être utilisée pour le criblage en alternative à la recherche de l'endophyte et permet de détecter 1% de graines endophytées et 5% de foin endophyté dans du matériel non endophyté (article 3, tableau 2, p.62). Ces résultats sont en accord avec la réglementation française autorisant la présence maximale de 20% d'endophyte dans un lot commercial de graines (JO du 2/07/2010).

Cette méthode a été utilisée dans le criblage de Ray-grass anglais sauvages collectés dans le Sud Ouest de la France (article 4, p.69) et l'analyse de facteurs modulant la production de lolitrème B dans du Ray-grass anglais cultivé (article 5, p.100).

Article 3

A new method for the determination of lolitrem B in plant materials

Repussard C.^a, Tardieu D.^a, Alberich M.^b, and Guerre P.^a

^a Université de Toulouse, INP, ENVT, UR Mycotoxicologie, F-31076 Toulouse, France

^b TOXALIM, Unité Mixte de Recherche 1331, Institut National de Recherche Agronomique, F-31027 Toulouse, France

Mots clés

Neotyphodium loli, lolitrem B, liquid chromatography, perennial ryegrass, seeds, hay

Article publié en 2014 dans *Animal Feed Science and Technology*, vol. 193, 141-147.

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Animal Feed Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anifeedsci

A new method for the determination of lolitrem B in plant materials

Céline Repussard^{a,*}, Didier Tardieu^a, Mélanie Alberich^b, Philippe Guerre^a^a Laboratoire de Recherche en Mycotoxicologie, École Vétérinaire de Toulouse, Institut National Polytechnique, F-31076 Toulouse, France^b TOXALIM, Unité Mixte de Recherche 1331, Institut National de Recherche Agronomique, F-31027 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 January 2013

Received in revised form 13 February 2014

Accepted 14 April 2014

Keywords:

Neotyphodium lolii

Lolitrem B

Liquid chromatography

Perennial ryegrass

Seeds

Hay

ABSTRACT

The endophyte fungus *Neotyphodium lolii* is associated with perennial ryegrass (*Lolium perenne* L) and can lead to the production of tremorgenic mycotoxins like lolitrem B, which is responsible for “Ryegrass staggers”, a disease in sheep, cattle and horses. We present a new simple, rapid, sensitive method to quantify lolitrem B in seeds and vegetative tissue. Lolitrem B is extracted using dichloromethane, purified on a solid-phase extraction (SPE) column and analysed by high performance liquid chromatography (HPLC) on a silicon column and a fluorimetric detector. This method is repeatable, reproducible, and linear at a concentration of 50–500 µg of lolitrem B/kg dry matter (DM) in seeds and hay. The limit of quantification was 50 µg of lolitrem B/kg DM. The mean recovery rates were 59.4 and 85.9% in seeds and hay, respectively. The method was applied to seeds and vegetative tissue collected in 2010 in France. Endophyte-infected and endophyte-free seeds and hay were mixed at varying percentage concentrations. The method was able to detect 1% of endophyte-infected material mixed with endophyte-free plant material.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), which is used as pasture or as harvested forage, is frequently infected by the endophyte fungus *Neotyphodium lolii* (*Clavicipitaceae*, *Ascomycota*) (White and Morgan-Jones, 1996). The fungus can produce two types of toxic alkaloids (Neill, 1941; Saikia et al., 2008; Wilson et al., 1991). Indole-diterpene alkaloids are the predominant type, mainly lolitrem B (Hovermale and Craig, 2001). This toxin is responsible for “Ryegrass staggers” in sheep, cattle and horses, and adversely affects productivity (Gallagher et al., 1982; Milne et al., 1999). The second type includes ergopeptines such as ergovaline (Schardl et al., 2012). However, no ergovaline specific toxicity caused by perennial ryegrass has been reported in livestock.

To avoid problems of animal health, grass varieties (perennial ryegrass, tall fescue) have been developed in symbiosis with non-toxicogenic endophyte (AR1, AR5, NEA2, AR37, AR542) (Fletcher, 2012). These endophytes did not produce animal toxins but continued to provide defense against insects. The mixtures were mainly sold in the pastoral industry in Australia,

Abbreviations: CV%, coefficient of variation; DM, dry matter; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HPLC, high performance liquid chromatography; LOD, limit of determination; LOQ, limit of quantification; R^2 , R squared; SD, standard deviation; SE+, endophyte-infected Grasslands Samson perennial ryegrass; SE–, endophyte-free Grasslands Samson perennial ryegrass; SPE, solid-phase extraction; UV, ultraviolet rays.

* Corresponding author. Tel.: +33 5 61 19 38 41; fax: +33 5 61 19 32 40.

E-mail address: c.repussard@envt.fr (C. Repussard).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.04.004>

0377-8401/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

New Zealand and USA. Even so, native endophyte-infected grasses are still found on all continents and are responsible for toxicosis in grazing animals. (Faeth, 2002; Leutschmann, 1992).

Economic losses and mortality due to lolitrem B have led to compulsory testing of all imported hay and seeds in several countries (Gensollen et al., 2005; Miyazaki et al., 2001). In France, all forage seed varieties have to be certified to contain less than 20% endophyte-infected seeds or the forage produced by the cultivation of these seeds must be shown to be free from – or to contain very low levels of – lolitrem B (Gensollen et al., 2005). Given these toxicological, economic and regulatory concerns, a sensitive, reliable analytical method is required to detect lolitrem B in plant tissues.

Most methods used to quantify lolitrem B in plants are adapted from the method of separation by high performance liquid chromatography (HPLC) followed by fluorimetric detection proposed by Gallagher et al., 1985 (Hovermale and Craig, 2001; Moyano et al., 2009; Tor-Agbidye et al., 2001). Lolitrem B is extracted from plant material using a mixture of chloroform and methanol (2:1, v/v) after shaking for 1 h. The extraction solution is evaporated and the dry residue dissolved in dichloromethane. Finally, the extract is purified in solid phase extraction (SPE) columns. This extraction procedure takes 3–4 h, and the operator is exposed to chloroform vapor, which is suspected of being carcinogenic to humans (World Health Organization International Agency for Research on Cancer, 1999).

The purpose of the present study was to develop a rapid, sensitive method for the detection and quantification of lolitrem B, and to validate the method according to French national guidelines (Bressolle et al., 1996; Caporal-Gautier et al., 1992). Linearity, precision, the quantification limit, and the range of determination were used to validate the method on hay and seeds.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and solutions

Standard lolitrem B was purchased from AgResearch Limited Ruakura Research Centre (Hamilton, New Zealand). Acetonitrile, methanol and dichloromethane (HPLC grade) were purchased from Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, USA). The reconstituted solution and the mobile phase solution were dichloromethane–acetonitrile (80:20, v/v).

2.2. HPLC system

The HPLC system consisted of an M 2200 pump (Bischoff, Leonberg, Germany) connected to a ProntoSil Si column, 3 μm , 150 mm \times 4.6 mm, 120 Å (Bischoff, Leonberg, Germany). The mobile phase was a mixture of dichloromethane–acetonitrile (80:20, v/v) delivered at a constant flow rate of 0.8 ml/min. Injections (20 μl) were carried out with an Alcott Model 718AL autosampler (Norcross, GA, USA). Detection was performed with an RF-10A XL detector (Shimadzu, Japan) at an excitation and emission wavelength of 268 and 440 nm, respectively (Gallagher et al., 1985). The resulting chromatograms were processed using PIC 3 software (ICS, Toulouse, France).

2.3. Standard solutions

A 5 $\mu\text{g/ml}$ stock standard solution of lolitrem B was prepared using a mixture of dichloromethane–acetonitrile (80:20, v/v). Calibration standards were prepared by diluting the stock standard solution with the same solvent to obtain solutions at concentrations ranging from 0.004 to 0.500 $\mu\text{g/ml}$. Standard solutions used to determine the calibration curve linearity between the area under the curve and concentration were 0, 0.004, 0.008, 0.016, 0.031, 0.063, 0.125, 0.250 and 0.500 $\mu\text{g/ml}$. Each standard was injected in triplicate.

Repeatability was assessed with two standard solutions (0.500 and 0.125 $\mu\text{g/ml}$) injected five times. Inter-day reproducibility was tested on one standard lolitrem solution (0.125 $\mu\text{g/ml}$) injected once a day for a period of 10 days ($n = 10$). To assess repeatability and inter-day reproducibility, the coefficients of variation in percent (CV%) were calculated. The method was considered to be valid when the CV% was less than 5% (Caporal-Gautier et al., 1992).

2.4. Extraction

The fresh material was placed in a ventilated ULE 500 oven (Memmert, Germany) for 24 h at 60 °C. Two hundred grams of oven-dried sample were then ground to 0.5 mm with a Cyclotech 1093 grinding mill (Foss, Hogande, Sweden). Two methods of extraction were compared: one using a mixture of chloroform and methanol (Gallagher et al., 1985) and one using dichloromethane.

2.4.1. Chloroform–methanol extraction

Chloroform–methanol was extracted according to Gallagher et al. (1985). Briefly, 1.00 g of oven-dried milled (seeds or hay) were weighed in a 50 ml conical polypropylene tube (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA, USA) and 15 ml of a mixture of chloroform–methanol (2:1, v/v) were added. Samples were placed on a Rotatest® 400 orbital shaker (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA, USA) for 1 h. The tube was then centrifuged for 10 min at 2500 \times g. An aliquot (1.0 ml) was evaporated to

dryness under a stream of nitrogen with a sample concentrator (Techne®, Staffordshire, ST15 OSA, UK). The dried extract was re-suspended in 2.0 ml of dichloromethane before purification.

2.4.2. Dichloromethane extraction

Dichloromethane extraction was performed as follows: 100.0 mg of oven-dried milled seeds or 500.0 mg of oven-dried milled hay were placed in a 15 ml conical polypropylene tube (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA, USA) and 10.0 ml of dichloromethane were added. Samples were vortexed and placed in a Bransonic ultrasonic bath (Bransonic 2510, Branson Ultrasonic Corp., Danbury, CT, USA) for either 1 h or 2 min. The tube was then centrifuged for 10 min at $2500 \times g$. The supernatant fraction was then filtered through a gauze swab.

2.5. Purification

2.5.1. Homemade columns

Solid phase extraction (SPE) columns were prepared as follows: in a 5 ml empty SPE cartridge (Silicycle, Quebec, Canada), 2 cm (about 300 mg) of Ergosil silica gel (Analtech Inc., Newark, DE, USA) were added, followed by a biological disc (Silicycle, Quebec, Canada). The SPE columns were preconditioned with 2.0 ml of dichloromethane.

2.5.2. Purification of chloroform: methanol extracts

The 2.0 ml of extract were purified through the homemade SPE column. The cartridge was then eluted with 1.0 ml of a mixture of dichloromethane–acetonitrile (80:20, v/v). The eluate was discarded. This step was followed by a further elution with 3.0 ml of the same solvent. The SPE column eluate from this step was collected. One hundred μl of the collected eluate were injected into the HPLC system.

2.5.3. Purification of dichloromethane extracts

Five ml of the filtered extract were passed through the homemade SPE column. The column was eluted with 2.0 ml of a mixture of dichloromethane and acetonitrile (80:20, v/v). The eluate collected was evaporated to dryness with a sample concentrator at 45°C under a stream of nitrogen. The dry residue was dissolved with 500.0 μl of eluting solvent before being injected into the chromatographic system (20 μl).

2.6. Validation of the whole method

To evaluate linearity and recovery, seeds and hay samples were fortified with lolitrem B at 50, 75, 100, 250 and 500 μg lolitrem B/kg of dry matter (DM). These fortified samples were obtained by adding 100.0 μL of standard solutions at 0.250, 0.375, 0.500, 1.250 and 2.500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively for hay and at 0.050, 0.075, 0.100, 0.250 and 0.500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively for seeds. They were analysed five times each to confirm the linearity of the method previously used with standard solutions and to determine the recovery rate by comparing the calibration curve of the spiked samples to the rate obtained with the standards (Caporal-Gautier et al., 1992).

Repeatability ($n=10$) and inter-day reproducibility were assayed on positive samples of hay and seeds (endophyte-infected samples). The same samples ($n=5$) were extracted and assayed on six occasions over a period of one month. Percentage CV was calculated to assess repeatability and inter-day reproducibility. The method was considered valid when the CV was less than 10% (Bressolle et al., 1996).

Unfortified samples ($n=10$) were analysed to measure baseline noise within the lolitrem B retention time range. The limit of detection (LOD) was defined as the smallest quantity of lolitrem B that yielded a signal three times higher than the noise ratio obtained with unfortified extracts. The limit of quantification (LOQ) was defined as the smallest amount of the compound that could be quantified with a CV of less than 20% ($n=5$) (Bressolle et al., 1996).

2.7. Assays on plant materials

Assays were performed on endophyte-infected (SE+) and endophyte-free (SE–) Grasslands Samson perennial ryegrass sown in 2009 in France. To determine the lowest detectable quantity of SE+ material that could be detected in the course of contamination of the SE– sample, 500 g of SE+ and SE– seeds and hay were analysed in triplicate. Four mixtures were used with decreasing levels of SE+ contamination (50:50, 90:10, 95:5, 99:1, w/w of SE– and SE+, respectively) and analysed in triplicate.

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using R version 2.11.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The linearity (R squared) of standard solutions and fortified samples was analysed with a Pearson's test. The response was considered linear when R squared was near 1 and the P value was less than 0.05.

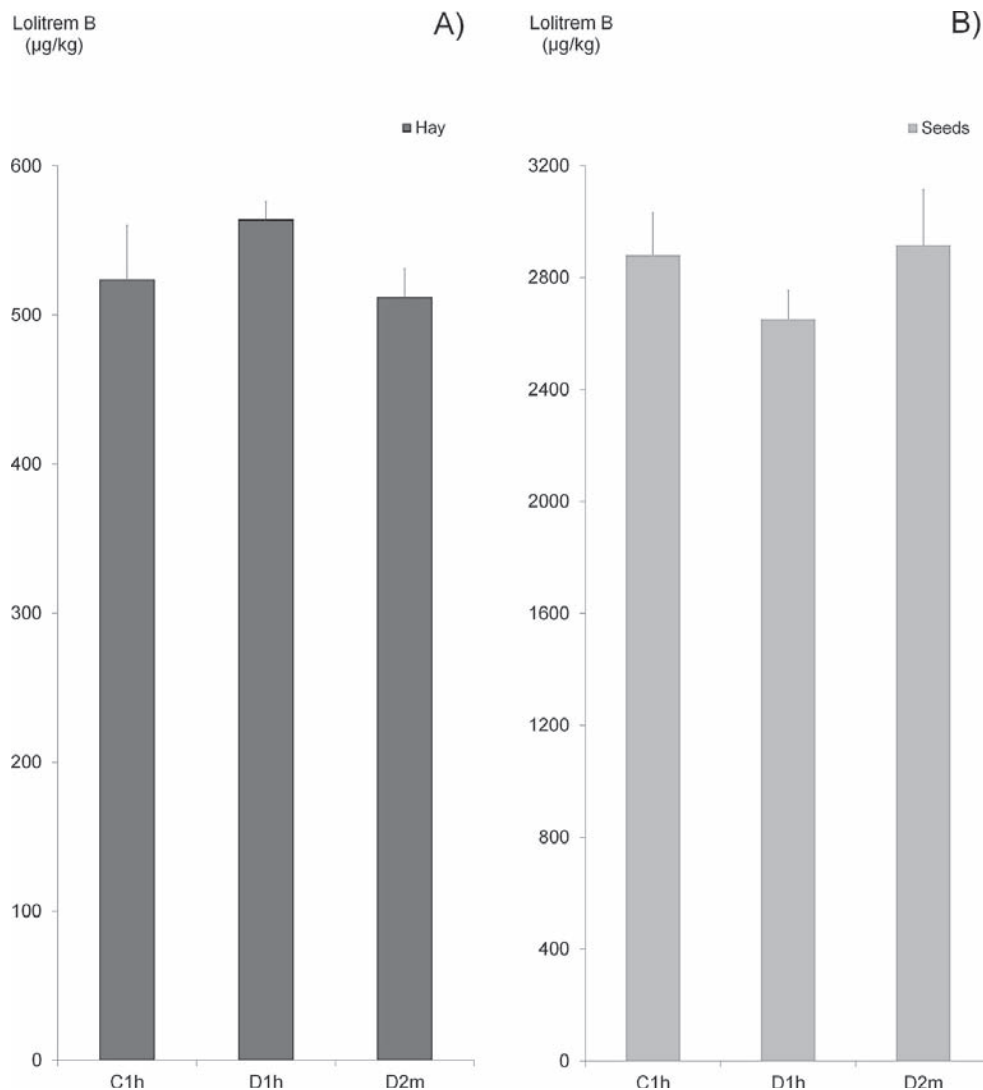


Fig. 1. Comparison of two methods and two extraction times applied to endophyte-infected perennial ryegrass hay (a) and seeds (b): 1 h of chloroform-methanol extraction in an orbital shaker (C1h), 1 h of dichloromethane extraction in an ultrasonic bath (D1h), 2 min of dichloromethane extraction in an ultrasonic bath (D2m).

In the same way, the three methods of extraction-purification of lolitrem B and the percentages of extraction of lolitrem B obtained at the different spiked levels were compared using a Kruskal–Wallis test. Results were not considered different when the P value was greater than 0.05.

The calculated and the measured concentrations of lolitrem B in mixtures of endophyte- infected and endophyte- free seeds and hay were compared with a Mann–Whitney test. The results were not considered different when the P value was greater than 0.05.

3. Results

3.1. HPLC calibration

Lolitrem B eluted at 4.8 min. The result obtained with the fluorimeter showed that the relationship between the peak area and the quantity of lolitrem B injected was linear over the range of concentrations tested (Pearson's test, $P < 0.05$) with an R^2 of 0.9998. The CV% of the repeatability of two standard lolitrem B solutions was 3.82% and 3.45% at 0.500 and 0.125 µg/mL respectively. The CV% of the reproducibility was 4.04%.

3.2. Comparison of the extraction-purification methods

Three methods of extraction on SE+ seeds and hay were compared (Fig. 1). Using the chloroform-methanol extraction method, the concentration of lolitrem B was 2879 ± 152 and 524 ± 36 µg lolitrem B/kg dry matter (DM) in seeds and hay, respectively. With dichloromethane extraction, the concentration of lolitrem B was 2651 ± 104 in seeds and 564 ± 12 µg

Table 1

Validation criteria for the whole method in seeds and hay.

	Seeds	Hay
Repeatability ($n = 10$) (CV%)	3.88	3.96
Reproducibility ($n = 5/d$; 6 days) (CV%)	5.93	6.94
Extraction (mean \pm SD, $n = 15$) (%) ^a	59.41 \pm 5	85.9 \pm 3.8
Limit of quantification (LOQ) ($\mu\text{g}/\text{kg DM}$)	50	50
Limit of determination (LOD) ($\mu\text{g}/\text{kg DM}$)	10	10

^a The five concentrations tested were 50, 75, 100, 250 and 500 μg lolitrem B/kg DM.**Table 2**Amounts of lolitrem B ($\mu\text{g}/\text{kg DM}$) in endophyte-infected (SE+) and endophyte-free (SE-) Grasslands Samson pure and mixed samples of seeds and hay ($n = 3$, mean \pm SD).

Lolitrem B ($\mu\text{g}/\text{kg DM}$)		Seeds		Hay	
Proportions (%)		Calculated	Measured	Calculated	Measured
SE-	SE+				
0	100	–	5202 \pm 164	–	1144 \pm 25
50	50	2601	2512 \pm 34	572	591 \pm 29
90	10	520	399 \pm 29	114	84 \pm 2
95	5	260	222 \pm 5	57	42 \pm 3
99	1	52	43 \pm 7	11	15 \pm 2
100	0	–	<LOD	–	<LOD

DM: dry matter, LOD: limit of detection.

lolitrem B/kg DM in hay after 1 h of sonication. When the extraction time was reduced to 2 min, lolitrem B contents were 2915 \pm 199 and 512 \pm 19 μg lolitrem B/kg DM in seeds and hay, respectively. No difference (Kruskal–Wallis test, $P > 0.05$) was found between the three methods.

3.3. Validation of the analytical method

The response of the detector to changes in the concentration of lolitrem B was linear between 50 and 500 μg lolitrem B/kg DM in fortified seeds and hay ($R^2 = 0.995$ and 0.9983 respectively, Pearson's test, $P < 0.05$). The recovery rates were constant whatever the spiked levels tested (Kruskal–Wallis test, $P > 0.05$). The mean values obtained were 59.41% for seeds and 85.9% for hay (Table 1).

The CV% of repeatability was 3.88 and 3.96% in seeds and hay, respectively (Table 1). The CV% of reproducibility was 5.93% in seeds and 6.94% in hay (Table 1).

The LOD and LOQ obtained were 10 and 50 μg lolitrem B/kg DM in seeds and hay. For the LOQ, the calculated CV% in seeds and hay was 7.7 and 1.6%, respectively (Table 1).

3.4. Assays on plant materials

The lolitrem B concentrations in the samples grown on French pastures are listed in Table 2. Pure SE+ seeds and hay contained 5202 \pm 164 μg and 1144 \pm 25 μg lolitrem B/kg DM, respectively. In pure SE-seeds and hay, lolitrem B levels were lower than the LOD.

Lolitrem B was measured in mixtures of SE- and SE+ samples in varying proportions, and the concentrations obtained were compared to the calculated concentrations. No difference was observed between the measured and the calculated concentrations, whatever the percentage of SE+ incorporated (Mann–Whitney's test, $P > 0.05$). This method was able to detect 1% and 5% of endophyte-infected material mixed with endophyte-free seeds and hay, respectively. When SE+ hay was incorporated at a concentration of 1%, the lolitrem B concentration was less than LOQ.

4. Discussion

Perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) used as pasture or forage is frequently infected by the endophyte fungus *N. lolii* and is responsible for "Ryegrass staggers" in sheep, cattle and horses. The results obtained with lolitrem B standard were consistent with previously reported results (Gallagher et al., 1985). Regarding the extraction-purification process, three methods were compared. No difference in chromatographic interferences was observed, whatever the method used. Some peaks that may correspond to substances that are less polar than lolitrem B were observed in the first part of the chromatograms but they did not interfere with the lolitrem B retention time (Gallagher et al., 1985). Interestingly, the use of dichloromethane reduced the extraction time to 2 min instead of 1 h using chloroform:methanol extraction) and decreased the volume of solvent

required for the analysis from 15 ml to 10 ml. These differences could be related to variations in the solubility of lolitrem B in dichloromethane and chloroform–methanol. Moreover, the use of dichloromethane avoided the evaporation step which exposes the operator to chloroform vapor that is possibly carcinogenic to humans (World Health Organization International Agency for Research on Cancer, 1999). The LOQ was validated at 50 µg lolitrem B/kg DM and the LOD at 10 µg lolitrem B/kg DM. The method was highly sensitive to the defined toxic levels (Tor-Agbidye et al., 2001). The mean recovery rate in hay was 86% which is consistent with results obtained using chloroform–methanol extraction (Gallagher et al., 1985; Moyano et al., 2009). In seeds, the mean recovery rate was 59%, demonstrating that the matrix can affect the extraction capacity of the toxin, and that the method should be validated for each type of material according to international guidelines (Eurachem Guide, 1998; Taverniers et al., 2004; Thompson et al., 2002).

The method described here was applied to seeds and hay collected in 2010 in France. The amounts of lolitrem B in endophyte-infected perennial ryegrass (SE+) are consistent with those reported in the literature (Ball et al., 1985; Durix et al., 1998; Hovermale and Craig, 2001), whereas the lolitrem B concentrations were below the LOD in endophyte-free perennial ryegrass (SE−). Thanks to its high sensitivity, the method enabled the detection of lolitrem B in SE− material that was only contaminated by low amounts of SE+ perennial ryegrass (1% and 5% in seeds and hay respectively). These results are consistent with French regulations, which allow 20% of SE+ in commercial perennial ryegrass seeds.

5. Conclusions

This paper presents a simple, rapid, sensitive method for the quantification of lolitrem B in seeds and hay. The method is suitable for regulation purposes in France and can be used to detect very small quantities of endophyte-infected perennial ryegrass producing lolitrem B in seeds and hay.

Acknowledgements

This study was supported by the French Government (*Fond Unique Interministériel, project number 082906510*) and the region of Midi-Pyrénées in the framework of a project qualified by the French Competitiveness Cluster AGRIMIP-INNOVATION.

References

- Ball, O.J.P., Prestidge, R.A., Sprosen, J.M., 1985. Interrelationships between *Acremonium lolii*, peramine, lolitrem B in perennial ryegrass. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1527–1533.
- Bressolle, F., Bromet-Petit, M., Audran, M., 1996. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B* 686, 3–10.
- Caporal-Gautier, J., Nivet, J.M., Algranti, P., Guillauteau, M., Histe, M., Lallier, M., N'Guyen-Huu, J.J., Russoto, R., 1992. Guide de validation analytique: rapport d'une commission SFSTP-I méthodologie [Analytical validation guide: report of a commission SFSTP-I methodology]. *STP Pharma Pratiques* 2, 205–226 (in French).
- Durix, A., Ravel, C., Bony, S., Balfourier, F., Guillaumin, J.J., Ghesquière, M., Chosson, J.F., Charmet, G., 1998. The influence of toxic Neotyphodid endophytes on perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Rev. Med. Vet.* 149, 528.
- Eurachem Guide, 1998. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. LGC, Teddington, Middlesex, UK, <http://Eurachem.bam.de>
- Faeth, S.H., 2002. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *OIKOS* 98, 25–36.
- Fletcher, L.R., 2012. Novel endophytes in New Zealand grazing systems: the perfect solution or a compromise? In: Young, C.A., Aiken, G.E., McCulley, R.L., Strickland, J.R., Schardl, C.L. (Eds.), *Epichloae, Endophytes of Cool Season Grasses: Implications, Utilization and Biology*. The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, OK, USA, pp. 5–13.
- Gallagher, R.T., Campbell, A.G., Hawkes, A.D., Holland, P.T., 1982. Ryegrass staggers: the presence of lolitrem neurotoxins in perennial ryegrass seeds. *N. Z. Vet. J.* 30, 183–184.
- Gallagher, R.T., Hawkes, A.D., Stewart, J.M., 1985. Rapid determination of the neurotoxin lolitrem B in perennial ryegrass by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 321, 217–226.
- Gensollen, V., Straëbler, M., De Goyon, B., Huyghe, C., Tessier, R., 2005. Les évolutions réglementaires dans le domaine des variétés et des semences [Regulatory developments in the field of forage plant varieties and seeds]. *Fourrages* 182, 237–244, In French.
- Hovermale, J.T., Craig, A.M., 2001. Correlation of ergovaline and lolitrem B levels in endophyte-infected perennial ryegrass. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 323–327.
- Leutschmann, A., 1992. Systematics distribution, and host specificity of grass endophytes. *Nat. Toxins* 1, 150–162.
- Milne, G.D., Russell, A.H., Russell, J.R., Russell, S.W., Russell, P.A., 1999. Experiences of ryegrass endophyte on farms on the East Coast of the North Island. In: Woodfield, D.R., Matthew, C. (Eds.), *Ryegrass Endophyte: An Essential New Zealand Symbiosis*, 7. New Zealand Grassland Association, Palmerston North, New Zealand, pp. 33–37.
- Miyazaki, S., Fukumura, M., Yoshioka, M., Yamanaka, N., 2001. Detection of endophyte toxins in the imported perennial ryegrass straw. *J. Vet. Med. Sci.* 63, 1013–1015.
- Moyano, S.A., Lanuza, F.A., Torres, A.B., Cisternas, E.A., Fuentes, M.V., 2009. Implementation of a method to determine lolitrem B in ryegrass (*Lolium perenne* L.) by liquid chromatography (HPLC). *Chilean J. Agric. Res.* 69, 455–459.
- Neill, J.C., 1941. The endophyte of *Lolium* and *Festuca*. *N. Z. J. Sci. Technol.* 23, 185a–193a.
- Saikia, S., Nicholson, M.J., Young, C., Parker, E.J., Scott, B., 2008. The genetic basis for indole-diterpene chemical diversity in filamentous fungi. *Mycol. Res.* 112, 184–199.
- Schardl, C.L., Young, C.A., Faulkner, J.R., Florea, S., Pan, J., 2012. Chemotypic diversity of epichloae fungal symbionts of grasses. *Fungal Ecol.* 5, 331–344.
- Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E., 2004. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TRAC* 23, 535–552.
- Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R., 2002. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 74, 835–855.
- Tor-Agbidye, J., Blythe, L.L., Craig, A.M., 2001. Correlation of endophyte toxins (ergovaline and lolitrem B) with clinical disease: fescue foot and perennial ryegrass staggers. *Vet. Hum. Toxicol.* 43, 140–146.

- White, J.F., Morgan-Jones, G., 1996. Morphological and physiological adaptations of Balansiae and trends in the evolution of grass endophytes. In: Redlin, S.C., Carris, L.M. (Eds.), *Ecology and Evolution*. APS Press, St Paul, MN, USA, pp. 133–154.
- Wilson, A.D., Clement, S.L., Kaiser, W.J., 1991. Survey and detection of endophytic fungi in Lolium germ plasm by direct staining and aphid assay. *Plant Dis.* 75, 169–173.
- World Health Organization International Agency for Research on Cancer, 1999. Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances. In: IARC (Ed.), *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, vol. 73. World Health Organization International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, pp. 131–182.

Présentation de l'article 4

Certaines souches d'*Epichloë festucae* var. *lolii* (anciennement *Neotyphodium lolii*, Leuchtman et al., 2014) peuvent produire des alcaloïdes toxiques comme le lolitrème B (LB) lorsqu'il est en symbiose avec *Lolium perenne* (Ray grass anglais, RGA). Cet indole-diterpène est considéré comme le composé toxique principal des RGA endophytés. Il est responsable de nombreux cas de « Ryegrass staggers » dans de nombreux pays tels que l'Australie, la Nouvelle-Zélande et les Etats-Unis. En France très peu de cas de toxicoses liées à l'ingestion de RGA endophyté ont été répertoriés. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences de prévalence comme par exemple la faible capacité des RGA endophytés sauvages à synthétiser du LB. Seule une étude française a mis en évidence que des RGA sauvages collectés en France pouvaient contenir jusqu'à 6 mg de LB /kg de matière sèche (MS) (Bony et al., 2001b). L'objectif de cet article a été de comprendre les relations pouvant exister entre le taux d'endophytisme des RGA sauvages, la capacité à synthétiser du LB par ces souches et les conditions environnementales du lieu de collecte. Cette étude a été réalisée en partenariat avec le laboratoire de l'EDB (UMR 5174, Université Paul Sabatier, Toulouse) sur des populations de RGA sauvages récoltés dans le Sud Ouest de la France. Pour cela, des recherches de corrélations entre les conditions pédoclimatiques du lieu de collecte et i) la prévalence de cet endophyte et ii) sa capacité à synthétiser du LB ont été réalisées (encadré 4, p.68).

Dans cette étude 27 populations = sites de RGA totalisant 474 individus ont été collectés entre 2009 et 2010 sur 7 départements du Sud Ouest : Aude, Aveyron, Gard, Haute-Garonne, Hérault, Pyrénées Atlantiques et Pyrénées Orientales (coordonnées GPS confidentielles). Les lieux de collecte ont été choisis pour être représentatifs de conditions environnementales contrastées. Ainsi tous les types climatiques du Sud Ouest sont représentés : le climat Méditerranéen, le climat des marges montagnardes, le climat du Sud Ouest et les climats océaniques (Joly et al., 2010). Les altitudes des sites de collecte variaient de 0 à 600 m. Des tissus frais de RGA ont été collectés pour les analyses ADN permettant de déterminer la présence d'*Epichloë* et de deux gènes des voies de biosynthèse du LB (*ltmE* et *ltmJ*). Pour s'affranchir du stade de développement de la plante les plants de RGA collectés endophytés ont été mis en culture en station expérimentale (Druelle, Aveyron). Après une année de culture des plantes endophytées environ 5 g de graines ont été collectés par échantillon puis séchés et broyés. Les concentrations en LB ont été déterminées par HPLC avec un détecteur à

fluorescence selon la méthode mise au point au laboratoire (article 3, p. 58). Le pourcentage d'extraction était de $59,4 \pm 5\%$ et la limite de quantification de $50 \mu\text{g LB/kg}$ matière sèche (MS).

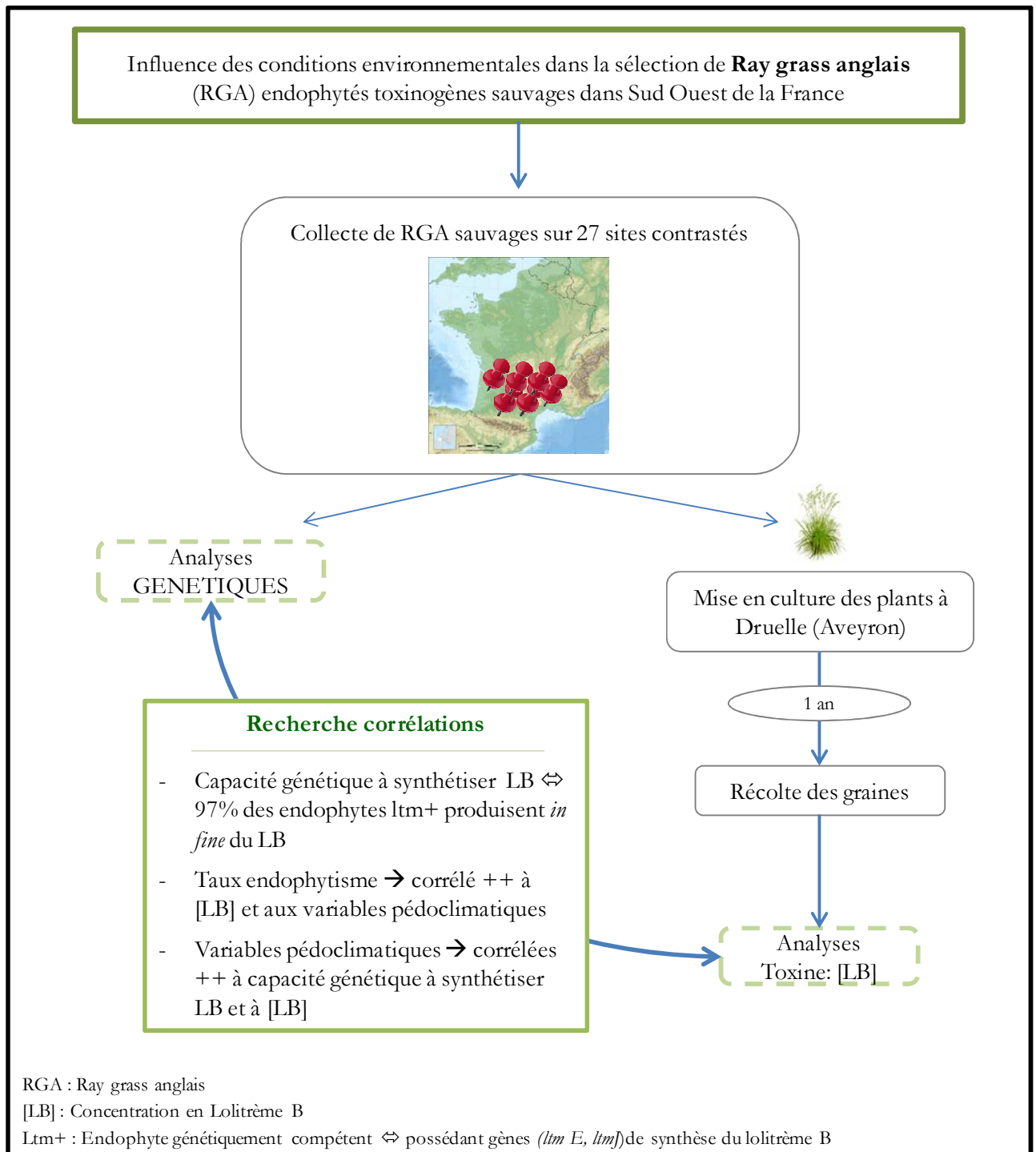
Pour évaluer l'influence des conditions environnementales différents indices/variables/données pédoclimatiques et topographiques ont été utilisés. Le pH du sol du lieu de collecte (BDAT-GISSOL, <http://bdat.gissol.fr/geosol/index.php>) ainsi que son altitude (IGN, NGF-IGN69, <http://www.geoportail.gouv.fr>) ont été testés. Les données Météo France comme la pluviosité, la température ou encore l'ensoleillement (<http://www.meteofrance.com>, <http://www.meteopassion.com/>, <http://climatedata.e-monsite.com/>) ont permis de calculer des variables et indices climatiques (Joly et al., 2010 ; Leguédois et al., 2011). Les variables utilisées sont les suivantes : moyenne annuelle des températures (TMO), nombre de jours avec une température inférieure à -5°C (TMN), nombre de jours avec une température supérieure à 30°C (TMX), amplitude thermique annuelle (différence entre la température moyenne de juillet et celle de janvier, cette variable est généralement reconnue comme critère de discrimination entre climats océaniques et continentaux) (TAM), nombre de jours de pluies (NJP), cumuls annuels de précipitation (PTO), nombre de jours de précipitation en janvier (PJH), nombre de jours de précipitations en juillet (PJE), écart des cumuls de janvier par rapport à la moyenne annuelle des cumuls mensuels (PDH), écart des cumuls de juillet par rapport à la moyenne annuelle des cumuls mensuels (PDE), moyenne annuelle d'heures d'ensoleillement (INS). Les indices utilisés sont les suivants : l'indice PRA est le rapport entre les abats d'automne (septembre + octobre) et ceux de juillet (ce rapport permet de bien séparer le domaine méditerranéen du reste), l'indice d'aridité estivale de De Martonne (IEDM) décrit la sécheresse estivale et le coefficient pluviométrique d'Emberger permet de définir les zones bioclimatiques de végétation (QE).

Soixante dix pourcent des plantes collectées étaient infectées avec *Epichloë festucae* var. *lolii*. Ce résultat est cohérent avec de précédentes études françaises (Lewis et al., 1997 ; Ravel et al., 1997). Néanmoins toutes les populations testées étaient endophytées contrairement à ces deux études françaises (respectivement 72 et 74% des populations infectées) (article 4, figure 1, p. 83) (Lewis et al., 1997 ; Ravel et al., 1997a). La grande majorité (77%) de ces champignons contenait le matériel génétique nécessaire à la synthèse de LB (présence des gènes *ltmE* et *ltmJ*). Pour ces endophytes génétiquement compétents (*ltm+*), 97% produisaient *in fine* du LB. **Ces résultats originaux laissent supposer qu'il existe un réel avantage pour l'endophyte à**

conserver ces loci dans son patrimoine génétique, même si la production de toxine représente un coût énergétique pour le champignon. Ce bénéfice pourrait être en lien avec l'amélioration de la résistance de la plante à certains facteurs environnementaux. Des corrélations entre variables pédoclimatiques du lieu de collecte des RGA et prévalence/compétence génétique (ltm)/teneurs en LB ont été étudiées. La culture des plantes en station expérimentale a permis de s'affranchir de l'influence des conditions de collecte (pédoclimat, stade de maturité de la plante) sur la teneur en LB. Principalement **deux variables seraient de bons prédicteurs** de la présence de l'endophyte (article 4, figure 3, p. 91), de sa compétence génétique et de sa teneur en LB (article 4, figure 5, p. 92) : le **PRA** et le **TMX**. Il est intéressant de remarquer que la faible fréquence des pluies (variables NPJ, PJH et PJE, respectivement le nombre de jours de précipitations annuels, en janvier et en juillet) semble favoriser la présence de plantes endophytées et les teneurs en LB élevées (article 4, tableau 1, p. 90). La forte corrélation ($p < 10^{-6}$) existant entre la prévalence du champignon dans les populations de RGA collectées et les teneurs en alcaloïde (article 4, figure 5, p.92) indique que les populations les plus endophytées sont celles qui produisent les teneurs en LB les plus élevées. Ainsi, bien que coûteuse en énergie, la forte production de LB est un avantage important pour le couple plante/endophyte. En mettant ces résultats en lien avec ceux observés pour le PRA et le TMX **les conditions de sécheresse semblent jouer un rôle dans la sélection des RGA endophytés toxinogènes.**

En ce qui concerne les niveaux de production en LB, soixante quinze pourcent des échantillons analysés contenaient des teneurs très variables allant de 0 à 22 mg LB/kg MS dans les graines (article 4, figure 2, p. 89). Des niveaux de LB très hétérogènes ont précédemment été observés sur des plants de RGA français en 2011 (Bony et al., 2001b). Etant donné le protocole expérimental suivi (mesure des teneurs en LB sur des graines après un an de culture dans des conditions homogènes), ces variations importantes dans le niveau de production en LB ne peuvent pas être expliquées par les **conditions pédoclimatiques ou le stade de maturité, une régulation génétique et/ou épigénétique pourrait en revanche expliquer les différences de synthèse de cet alcaloïde.**

Encadré 4 : Etude de populations de Ray grass anglais sauvages



Article 4

Lolitre biosynthesis of *Epichloe* endophytes in perennial ryegrass originated from contrasted environments of South-West France – Genetic and environmental aspects.

Navaud O.^{a,b}, Repussard C.^c, Chamsi O.^{a,b}, Guerre P.^c, and Gryta H.^{a,b}

^a Université de Toulouse, EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), UMR5174 CNRS, UPS, ENFA, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

^b CNRS, UMR5174 EDB, F-31062 Toulouse, France

^c Université de Toulouse, INP, ENVT, UR Mycotoxicologie, F-31076 Toulouse, France

Mots clés

Epichloë festucae var. *lolii*, lolitre B, perennial ryegrass, biosynthesis

Article en cours d'écriture

Lolitrems biosynthesis of *Epichloë* endophytes in perennial ryegrass originated from contrasted environments of South-West France – Genetic and environmental aspects.

Olivier Navaud^{1,2}

Céline Repussard³

Ousama Chamsi^{1,2}

Philippe Guerre³

Hervé Gryta^{1,2}

¹ Université de Toulouse, EDB (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique), UMR5174 CNRS, UPS, ENFA, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

² CNRS, UMR5174 EDB, F-31062 Toulouse, France

³ Laboratoire Mycotoxicologie, Université de Toulouse, INPT, ENVT, F-31076 Toulouse, France

ABSTRACT

Epichloid endophytes are frequent symbionts for cool-season grasses, including perennial ryegrass, *Lolium perenne* L.. Some strains of the most frequent endophyte, *Epichloë festucae* var. *lolii*, could produce alkaloids like lolitrem B, that can protect the plants from grazing, but thus are toxic for livestock. This indole-diterpen is considered as the predominant toxic compound in endophyte-infected ryegrass. In order to decipher the relations between the endophyte prevalence, the toxin expression capabilities and the influence of environment conditions, a collection of 27 *L. perenne* natural populations originated from contrasted environments in South-West France was screened by PCR for the presence of the endophyte. Seeds were sampled and the progeny was cultivated in a common garden. Using both genetic markers of lolitrem B biosynthesis, and HPLC measuring the alkaloid concentration in seeds, we tested for capability and expression *in fine*, respectively. The genetic detection was in agreement with expression in seeds, demonstrating its valuable use in early biological screening. Moreover, pattern of lolitrem B capability and expression seems to indicate a likely selection linked with climatic parameters, especially drought conditions and heat in summer. Part of the observed variability of lolitrem B concentrations could be linked to a genetic selection or epigenetic regulation that remains to characterize. A probable involvement of lolitrem B in abiotic environmental stress response seems to indicate a role of this alkaloid in other stress response than the known biotic ones.

INTRODUCTION

Endophytes belonging to the genus *Epichloë* (Leuchtman et al 2014) are frequent symbionts of cool-season grasses, including the perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), a widely used pasture grass. Some strains of the most frequent endophyte in ryegrass, *Epichloë festucae* var. *lolii*, could enhance grass resistance to several biotic and abiotic stresses such as insect, herbivory and drought (Malinowski and Belesky 2000; Kuldau and Bacon 2008). These advantages for the plant host, characteristic of a mutualistic symbiosis, could be the result of a long co-evolution (Clay and Schardl 2002; Schardl et al 2008). Recently, and congruent with this hypothesis, these symbionts are proposed as manipulators of plant reproductive biology (Gorischek et al 2013).

The endophyte could produce various alkaloids like peramine, ergovaline or lolitrem B (Schardl et al 2013). The lolitrem B, an alkaloid of the indole-diterpen family (Young et al 2006), is considered as the predominant toxic compound in endophyte-infected ryegrass and is thus dangerous for livestock.

In addition to the existing various endophyte genotypes (van Zijl de Jong et al 2008), alkaloid concentrations in endophyte-infected ryegrass are affected by various factors, such as season (Ball et al 1995), temperature (Brosi et al 2011), drought (Hesse et al 2003; Hesse et al 2005; Hahn et al 2008; Zhou 2014), nutrients (Rasmussen et al 2007), plant genotype (Easton et al 2002; Spiering et al 2005), development (Tan et al 2001) and competition with heterogeneous biotic environment (light and nitrogen competition with plant community) (Roscher et al 2008; Roscher et al 2011).

A potential problem is contamination of commercial seeds with toxic strains (Dombrowski et al 2006). In France, since 2006 no more than 20% of endophyte containing seeds is permissible in commercial seeds (Gensollen et al 2005). Apart of the cultivated pastures, there is no monitoring of the natural populations or turfs that can contaminate the pasture with endophyte-infected seeds. It is scientifically interesting to understand the complex relations

existing between the endophyte behavior and its environment. In this work, we analysed behaviour of natural ryegrass populations originated from contrasted environments from Southern France in a common garden. The results of prevalence, genetic capability and real concentrations of lolitrem B in seeds are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Biological sampling and cultivation

From 2009 to 2010, 27 french *Lolium perenne* natural populations were sampled in South-West of France, totalizing 474 individuals. The locations were chosen to provide contrasting environmental conditions to the sampling set. Indeed, all climatic types of the South-West of France are sampled: Mediterranean, mountains margin, SW basin and oceanic climates are represented (Joly, 2010). Similarly, sites are located at various altitudes, from sea level to more than 600m of elevation. Seeds were harvested for cultivation in a common garden at Druelle (Aveyron, France) and fresh tissues were sampled for DNA extraction (see above). In 2010, seeds of the progeny were sampled for chemical analysis (see above).

DNA extraction

Fresh tissues from at least 3 tillers of each plant analysed were sampled and stored à -20°C in microfuge tubes containing CTAB 2x preservation solution (100 mM Tris-HCl (pH 8), 1.4 M NaCl, 20 mM Na₂EDTA, 2% CTAB) and stored at -20°C until DNA extraction. DNA was extracted and purified by using the Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) according to the manufacturer's recommendation and with few modifications. Each whole sample was crushed with sand in 600µL of Nuclei Lysis Solution, half of this volume was stored at -20°C for later use, and the rest was extracted following manufacturer's protocol with a final dilution in 40µL of sterile water.

Endophyte detection

All samples were screened for presence of the endophyte by polymerase chain reaction (PCR), using b-tubulin-2 STS marker (Dombrowski et al 2006). Amplifications were carried out in a final volume of 25 µL containing 10 to 100ng of DNA, 0.2 mM of each dNTP, 1 µM of each primer, 0,02 U.µL⁻¹ of Taq DNA polymerase (GoTaq, Promega) with the appropriate reaction buffer (5x Green Buffer, Promega). Reactions were performed in a Mastercycler Gradient

thermocycler (Eppendorff) with the following PCR program: 3 min of initial denaturation at 94°C, followed by a touchdown: 7 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 65°C (-1°C/cycle), and 30 sec at 72°C, then a classical PCR with 40 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 58°C, and 30 sec at 72°C, and a final 2min extension. Amplified products were separated on 1.5% agarose gels and visualized by staining with ethidium bromide. When positive, the sample produced a ~370bp-product size. A chloroplastic marker (RG1/RG2) was use as positive control (Delozier et al 1999).

Lolitrems genotyping for lolitrems B capability

Presence of essential genes for lolitrems B-biosynthesis (*ltmE* and *ltmJ*) was tested by PCR for samples originated from plants possessing the endophyte. The targeted regions were amplified following (Young et al 2009). The NRPS1 and Chitinase A genes were used as positive controls (Rasmussen et al 2007).

Chemical analyses of lolitrems B

For each infected plant, seeds (around 5g) were harvested and placed in a ventilated oven at 60°C for 24 hours. Dried seeds were ground to powder (0.5 mm diameter) and stored at -20°C until used for further analyses.

Lolitrems B concentrations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) using fluorescence detection according to the method of Repussard and colleagues (Repussard et al 2014). One hundred \pm 5 mg of seed samples were extracted with 10 mL of dichloromethane for 2 minutes in an ultrasonic bath. After the purification step on an Ergosil Solid Phase Extraction (SPE) column, 20 μ L of the sample eluted with dichloromethane-acetonitrile (80:20, v/v) were injected in the HPLC system. Separations were achieved using a Prontosil Si column (3 μ m, 150x4.6mm, 120Å). The mobile phase consisted of dichloromethane- acetonitrile (80:20, v/v) delivered at a constant flow rate of 0.8 mL/min.

Detection was achieved using fluorescence detection with excitation at 268 nm and emission at 440 nm.

Lolitrem B standard was purchased from AgResearch (Dr Sarah Finch, AgResearch limited Ruakura Research Center, Hamilton, New Zealand). For quantification we used a calibration curve: 0- 50- 100 -250- 500 µg/kg dry matter (DM) and a limit of detection of 10 µg/kg DM. All the concentrations higher than the maximum of the calibration curve (500 µg/kg DM) were diluted before injection.

Statistical analysis – Soil and climate variables

All biological data were tested against soil pH (BDAT-GISSOL (<http://bdat.gissol.fr/geosol/index.php>)), climatic variables or indexes are extracted from (Joly et al 2010; Leguédouis et al 2011) and compiled Meteo France data (<http://www.meteofrance.com>, <http://www.meteopassion.com/>, <http://climatedata.emonsite.com/>). The parameters: altitude (ALT), annual mean temperature (TMO), number of days with a temperature below -5°C (TMN), number of days with a temperature above 30°C (TMX), annual temperature range (TAM), number of rainy days (NJP), average annual precipitation amounts (PTO), number of rainy days in january (PJH), number of rainy days in July (PJE), deviation of the January rainfalls compared to the annual average of monthly rainfalls (PDH), deviation of the July rainfalls compared to the annual average of monthly rainfalls (PDE), annual mean hours of sunshine (INS). The PRA index is the ratio between autumn and July rainfalls; it describes the strength of summer drought. It characterizes the mediterranean climate (see (Joly et al 2010) and references therein), as does the Im for vegetation (Index of mediterraneity (Leguédouis et al 2011)). The IEDM (De Martonne summer aridity Index) is another proxy that describes summer drought (Joly et al 2010). The Emberger's pluviometric coefficient (QE) is an index that permits to define vegetation bioclimatic zones (see (Lebourgeois and Piedallu 2005)). Statistical analyses were performed

with PAST 3.02 (Hammer et al 2001). To avoid any problem of non-normal distribution of the data, all parameters were tested for correlation using Spearman's r_s , Mann-Whitney test and associated p -values.

RESULTS

Prevalence of endophyte

The results showed a large variability of endophyte prevalence between the 27 tested locations. The prevalence varied from 32 to nearly 100 % of infection by the endophyte, with a mean of 70 %. A large majority of the tested populations (80%) showed a prevalence of more than 50 % (Fig. 1).

Lolitrein B biosynthesis capability

The screening for *ltmE* and *ltmJ* genes of 208 infected plants resulted in a potential genetic capability for 161 (77%) of them. All samples positive for *ltmE* are also positive for *ltmJ*. No *ltm* genes were found in non-infected (control) plants, thus the marker showed a good specificity for *Epichloë* endophyte.

Lolitrein B biosynthesis expression

Seeds from the genetically-tested samples were used to detect the lolitrein B and determine its concentration by HPLC. We identified 75% of infected individuals as lolitrein B-producers. All of them were Ltm+. For all samples negative for *ltmE/J* genes, no lolitrein B was detected. At the contrary, although the large majority of samples genetically positive produced lolitrein B (97%), a few of them lacked the expression. The level of expression varied from 0 to close to 22mg/kg, with a mean of 8,4 mg/kg (Fig. 2).

Correlation to soil and climatic variables

Prevalence (n=474)

On the investigated populations, the prevalence of the endophyte showed a strong correlation with several climatic parameters (Table 1-A): TMX ($p < 0.05$), NJP ($p < 0.0001$), PJH ($p < 0.01$), PJE ($p < 0.01$), INS ($p < 0.001$). The best predictor of the prevalence seems to be the PRA index (Figure 3), with a positive correlation coefficient r_s of 0.73 ($p < 0.0001$). Other climatic indexes

showed a good correlation like Im ($p < 0,01$) or IEDM ($p < 0.01$). The QE index is marginally significant ($p = 0.06$) for a negative correlation. The prevalence is also correlated with the soil pH ($r_s = 0.45$, $p < 0.05$). Similar result was observed by Dobrindt and colleagues (Dobrindt et al 2013).

Genetic competence (N=208)

The results for genetic screening of E+ individuals for the presence of lolitrem B-biosynthesis essential genes are summarized in **Table 1-B**. The Ltm+ individuals showed a highly significant association with altitude ($p < 0.0001$), with a lower median altitude (**Fig. 4**). Climatic variables like mean annual temperature ($p < 0.001$) and heat period length ($p < 0.05$) were positively and significantly associated with Ltm+ symbiota. The inverse was observed with cold period length ($p < 0.001$), with a shorter length for Ltm+. No other climatic parameter presented a differential behaviour between Ltm+ and Ltm- samples. However, it's noteworthy that the PRA index is the only positively linked to genetically lolitrem-competent endophytes ($p < 0.05$). The mediterranean index (Im), based on vegetation data (at the contrary of PRA), didn't show any difference between Ltm+ and Ltm-. The soil pH was not associated with Ltm+ frequency.

Lolitrem B expression (N=208)

The strength of the toxic expression in seeds positively and strongly correlated with the endophyte prevalence in populations ($r_s = 0.39$, $p < 10^{-6}$) (**Table 1-C, Fig. 5**). Comparing the measure of lolitrem B concentration in seeds to various environmental parameters resulted in numerous correlations. The expression showed a strong negative correlation with altitude ($r_s = 0.29$, $p < 10^{-3}$), a positive relationship with mean temperature and heat period length ($p < 0.01$), and a negative correlation with cold period length ($p < 0.05$). Similarly, the expression negatively correlated with number of rainy days ($r_s = -0.29$, $p < 10^{-3}$), but interestingly absolutely not with

total annual precipitation ($r_s = -0.06$, $p > 0.1$). This pattern is confirmed by the correlation with the number of rainy days in winter and in summer ($p < 0.05$).

Among the indices, and as for prevalence analysis, the PRA index seemed to be the better proxy of lolitrem B expression with a strong positive correlation ($r_s = 0.31$, $p < 10^{-4}$), while IEDM and QE are negatively and significantly correlated with expression ($p < 0.05$). The mediterranean vegetation index (Im) is positively related to the expression ($r_s = 0.20$, $p < 0.05$). At the contrary of the prevalence, the expression of lolitrem B in seeds is not significantly correlated with pH, as observed for genetic capability.

DISCUSSION

Comparison between patterns of prevalence, genetic competence and expression of lolitrem.

The prevalence measured in this work is significantly different to that previously reported in several reports in the 90s in France or in Europe for the perennial ryegrass and related species. It's noteworthy that all populations were infected in our study, at the contrary of previous works (Lewis et al 1997; Ravel et al 1997b) (72% and 74% of infected populations, respectively). Indeed, Ravel and Lewis showed a lack of infection for more than a quarter of prospected populations and when infected, infection rates among population were generally low (Lewis et al 1997). However, there is large variation between the regions prospected. Whereas we focused our study in southern regions of France, supposed to be more prone to endophyte prevalence (Lewis et al 1997), previous works focused in northern countries or at a European scale. More, a strong differences between the technical approaches (PCR, microscopy or immunology) necessary lead to some differences. Similarly, the range of infection is different than previously reported (Ravel et al 1997b) with a higher mode. Therefore, how much has evolved the prevalence since two decades is difficult to ascertain, although a higher number of infected populations could not be excluded. The possible alteration of the prevalence equilibrium in French populations of *L. perenne* in southern regions could be interestingly related to climate change (Chaouche et al 2010).

The vast majority (77%) of the endophyte-containing perennial ryegrass sampled seems to harbor an endophyte which is *bona fide* genetically competent for lolitrem B biosynthesis. The frequency of the genetic competence for this indole-diterpen alkaloid is obtained for the first time on natural populations, and on this area, so that no comparison was available. However, this value is high, like was the endophyte prevalence. It seems that the supposed benefice of that genetic feature is well enough to maintain the essential loci in natural populations. The

results validated the use of PCR screening of the ryegrass for alkaloid biosynthesis capability as described before (Young et al 2009).

The fact that the overwhelming majority of the genetically competent endophytes (97%) produced *in fine* the alkaloid lets suppose a very frequent advantage of the expression, despite of the high energetic cost of this synthesis. Indeed, up to now, most of the studies focused on relationships between biotic stresses, mostly grazing (see (Malinowski and Belesky 2000) for review). However, some authors previously reported a potential involvement of endophytes in abiotic stress response, especially for drought stress (Lewis et al 1997; Ravel et al 1997a; Hesse et al 2003; Hesse et al 2005; Hahn et al 2008). Our results confirmed this hypothesis.

Interactions between the 3 investigated features (prevalence, genetics and expression) and environmental parameters.

The PRA seems the better proxy for all these biological features. Indeed, other tested climatic indices (IEDM, QE) didn't show a correlation as good as PRA did for all the investigated biological features. It's noteworthy that the Mediterranean vegetation index (Im), doesn't always correctly fit our data while a climatic index (like PRA) could easily explain a significant part of the observed variation. It seems that, at least in our dataset, endophyte-related behavior is not directly influence by vegetational component of the environment, but more directly by abiotic factors. This hypothesis is supported by the various correlations between biological features and climatic factors, mainly temperature and rainy days frequency. Interestingly, although the frequency of rainy days is a good negatively correlated predictor of lolitrem B expression, the amount of annual precipitation is not. This absence of relation with total precipitation was previously noted (Lewis et al 1997). This could be explain by the root system of the perennial ryegrass. This mesophytic species is described as mainly non-tolerant to large variations in soil water availability, displaying a relatively shallow and thin root system, characteristics of a resource-acquisitive species originated from mostly unstressed environments ((Fort et al 2013)

and references therein). So that, even low precipitation is efficient to the plant, reducing the drought risk. In these conditions, drought pressure is release and it is likely that advantage conferred by endophyte decreases. The symbiosis-conferred advantage remains only with climates with long summer drought periods, even with strong but low-frequency rainfalls, as expected under Mediterranean conditions. This could result in drought-tolerant holobionts (symbiota) naturally selected under stressful conditions.

Interactions between prevalence and alkaloid expression/concentration.

The clear association between endophyte prevalence among populations and lolitrem B expression seems to indicate a strong advantage despite the high energetic cost for the biosynthesis of the alkaloid. Since there is a correlation between prevalence / genetic capability / lolitrem concentration and water stress, it is very likely that drought drive a strong selection pressure to ensure a better protection with more infected plants expressing themselves more protective alkaloid.

Variation between individuals originated from contrasted climatic conditions

The observed expression levels of lolitrem B are consistent with previous measured values in perennial ryegrass, with a maximum value close to 22mg/kg (Hovermale and Craig 2001; Young et al 2006; Zhou 2014). The large fluctuations of expression for samples harvested at the same date excluded the known regulation by the season. Indeed, lolitrem B concentrations seem seasonally regulated, with highest expression from summer to early autumn (Ball et al 1995), *ie* during the dry season. Additionally, we monitored a wide panel of individuals maintained in a common garden, in which the pedoclimatic conditions could be considered as homogeneous. Therefore, none of the local environment parameters are supposed to be able to induce significant variability in lolitrem B expression. The observed variations correlated with climatic factors of the region parental ryegrasses are originated from, seems to indicated a maintain of the selection concerning this trait. Whatever the partner in cause (plant host, its

endophyte or both), the kind of regulation involved in these variations are either genetic and/or epigenetic and inherited by the next generation.

Various alkaloid clusters are known to be tuned, so it's possible that the regulation needs many generations or seasons, to be modulated to another level adjusted to the new environmental stimuli context. The time laps for regulation, if any, is currently unknown. Among populations, the large variation observed in alkaloid concentration could support the hypothesis of an influence of the plant genotype (or alternatively an epigenetic regulation by factors currently unknown). Indeed, it has been suggested that both plant and endophyte genotypes influence each other (Easton et al 2002; Hesse et al 2003; Hesse et al 2004; Cheplick 2004; Spiering et al 2005; Hahn et al 2008). Previous works have indeed suggested these endophytic fungi influence the plastic responses of the host plant, and that the specific interaction between partner genotypes determines the extent of the observed plasticity (see (Cheplick 1997)). Subsequent analyses clearly pointed out an increase of root system and of the root:shoot ratio with specific symbiota in response to water stress (Hesse 2003, 2004, 2005). More recently, several teams demonstrated that alkaloids (including lolitrem B) expression was altered in response to drought stress (Hahn et al 2008; Zhou 2014). Up to now, no physiological link was made between alkaloid expression and developmental plastic response.

Interestingly, the response was altered in a way that was specific to each symbiotic association (Hahn et al 2008; Zhou 2014). Indeed, this response to drought seems modulated by the genotype of the host plant (West 2007), with an increase of these metabolites only in drought-tolerant genotypes (Zhou 2014), although cultivars and native populations could lead to different results. This genotype-dependent interaction response could explain part of the variability observed between samples among populations under similar environmental conditions. Our work is therefore in good agreement with this model, leading to the conclusion than a complete knowledge of both genetic nature of biotic partners (endophyte and host-

plant) and of the whole environmental conditions are necessary to completely decipher the interaction outcomes.

Further investigations to settle the question are ongoing. If it is actually an (epi)genetic adaptation to new environmental conditions, it would be interesting to challenge this hypothesis in the context of climate change (Brosi et al 2011), especially in the Mediterranean basin (Chaouche et al 2010) and to evaluate the impact of this change in toxicity risk.

AKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the French Government (Fond Unique Interministériel) and the region of Midi-Pyrénées on a project qualified by the French Competitiveness Cluster AGRIMIP-INNOVATION.

REFERENCES

- Ball OJ, Prestidge RA, Sprosen JM (1995) Interrelationships between *Acremonium lolii*, Peramine, and Lolitrem B in Perennial Ryegrass. *Appl Environ Microbiol* 61:1527–1533.
- Brosi GB, McCulley RL, Bush LP, et al (2011) Effects of multiple climate change factors on the tall fescue-fungal endophyte symbiosis: infection frequency and tissue chemistry. *New Phytol.* doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03532.x
- Chaouche K, Neppel L, Dieulin C, et al (2010) Analyses of precipitation, temperature and evapotranspiration in a French Mediterranean region in the context of climate change. *Comptes Rendus Geosci* 342:234 – 243.
- Cheplick GP (1997) Effects of endophytic fungi on the phenotypic plasticity of *Lolium perenne* (*Poaceae*). *Am J Bot* 84:34.
- Clay K, Schardl C (2002) Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *Am Nat.* doi: 10.1086/342161
- Delozier V, Peltier D, Jalouzot R (1999) Development of SCARs useful for species identification in the genus *Lolium*. *Agronomie* 19:145–153.
- Dobrindt L, Stroh H-G, Isselstein J, Vidal S (2013) Infected–not infected: Factors influencing the abundance of the endophyte *Neotyphodium lolii* in managed grasslands. *Agric Ecosyst Environ* 175:54 – 59.
- Dombrowski JE, Baldwin JC, Azevedo MD, Banowetz GM (2006) A Sensitive PCR-Based Assay to Detect *Neotyphodium* Fungi in Seed and Plant Tissue of Tall Fescue and Ryegrass Species. *Crop Sci* 46:1064–1070.
- Easton HS, Latch GCM, Tapper BA, Ball OJ-P (2002) Ryegrass Host Genetic Control of Concentrations of Endophyte-Derived Alkaloids. *Crop Sci* 42:42:51–57.
- Fort F, Jouany C, Cruz P (2013) Root and leaf functional trait relations in *Poaceae* species: implications of differing resource- acquisition strategies. *J Plant Ecol* 6:211–219.
- Gensollen V, Straëbler M, De Goyon B, et al (2005) Les évolutions réglementaires dans le domaine des variétés et des semences. *Fourrages* 182: 237–244.
- Gorischek AM, Afkhami ME, Seifert EK, Rudgers JA (2013) Fungal symbionts as manipulators of plant reproductive biology. *Am Nat* 181:562–570.
- Hahn H, McManus MT, Warnstorff K, et al (2008) *Neotyphodium* fungal endophytes confer physiological protection to perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) subjected to a water deficit. *Environ Exp Bot* 63:183 – 199.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron* 4:9.
- Hesse U, Schöberlein W, Wittenmayer L, et al (2003) Effects of *Neotyphodium* endophytes on growth, reproduction and drought-stress tolerance of three *Lolium perenne* L. genotypes. *Grass Forage Sci* 58:407–415.

- Hesse U, Schöberlein W, Wittenmayer L, et al (2005) Influence of water supply and endophyte infection (*Neotyphodium* spp.) on vegetative and reproductive growth of two *Lolium perenne* L. genotypes. *Eur J Agron* 22:45 – 54.
- Hovermale JT, Craig AM (2001) Correlation of ergovaline and lolitrem B levels in endophyte-infected perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc* 13:323–327.
- Joly D, Brossard T, Cardot H, et al (2010) Types of climates on continental France, a spatial construction. *Cybergeo Eur J Geogr*. doi: 10.4000/cybergeo.23155
- Kuldau G, Bacon C (2008) Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biol Control* 46:57 – 71.
- Lebourgeois F, Piedallu C (2005) Appréhender le niveau de sécheresse dans le cadre des études stationnelles et de la gestion forestière à partir d'indices bioclimatiques. *Rev For Fr* 57:331–356.
- Leguédou S, Party J-P, Dupouey J-P, et al (2011) The vegetation map of the CNRS going numerical: the geographical database of the vegetation of France. Harmonised vector cover at 1/1 000 000 and georeferenced scan at 1/200 000. *Cybergeo Eur J Geogr*. doi: 10.4000/cybergeo.24688
- Leuchtman A, Bacon CW, Schardl CL, et al (2014) Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloa*. *Mycologia* 106:202–215.
- Lewis GC, Ravel C, Naffaa W, et al (1997) Occurrence of *Acremonium* endophytes in wild populations of *Lolium* spp. in European countries and a relationship between level of infection and climate in France. *Ann Appl Biol* 130:227–238.
- Malinowski DP, Belesky DP (2000) Adaptations of Endophyte-Infected Cool-Season Grasses to Environmental Stresses: Mechanisms of Drought and Mineral Stress Tolerance. *Crop Sci* 40:923–940.
- Rasmussen S, Parsons AJ, Bassett S, et al (2007) High nitrogen supply and carbohydrate content reduce fungal endophyte and alkaloid concentration in *Lolium perenne*. *New Phytol* 173:787–797.
- Ravel C, Courty C, Coudret A, Charmet G (1997a) Beneficial effects of *Neotyphodium lolii* on the growth and the water status in perennial ryegrass cultivated under nitrogen deficiency or drought stress. *Agronomie* 17:173–181.
- Ravel C, Michalakis Y, Charmet G (1997b) The effect of imperfect transmission on the frequency of mutualistic seed-borne endophytes in natural populations of grasses. *Oikos* 80:18–24.
- Repussard C, Zbib N, Tardieu D, Guerre P (2014) Endophyte Infection of Tall Fescue and the Impact of Climatic Factors on Ergovaline Concentrations in Field Crops Cultivated in the South of France. *J Agric Food Chem*. doi: 10.1021/jf503015m

- Roscher C, Kutsch WL, Schulze E-D (2011) Light and nitrogen competition limit *Lolium perenne* in experimental grasslands of increasing plant diversity. *Plant Biol Stuttg* 1:134–144.
- Roscher C, Schumacher J, Weisser WW, Schulze E-D (2008) Genetic Identity Affects Performance of Species in Grasslands of Different Plant Diversity: An Experiment with *Lolium perenne* Cultivars. *Ann Bot* 102:113–125.
- Schardl CL, Craven KD, Speakman S, et al (2008) A novel test for host-symbiont codivergence indicates ancient origin of fungal endophytes in grasses. *Syst Biol* 57:483–498.
- Schardl CL, Florea S, Pan J, et al (2013) The epichloae: alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses. *Curr Opin Plant Biol* 16:480–488.
- Spiering MJ, Lane GA, Christensen MJ, Schmid J (2005) Distribution of the fungal endophyte *Neotyphodium lolii* is not a major determinant of the distribution of fungal alkaloids in *Lolium perenne* plants. *Phytochemistry*.
- Tan YY, Spiering MJ, Scott V, et al (2001) In planta regulation of extension of an endophytic fungus and maintenance of high metabolic rates in its mycelium in the absence of apical extension. *Appl Environ Microbiol* 67:5377–5383.
- Van Zijll de Jong E, Dobrowolski MP, Bannan NR, et al (2008) Global Genetic Diversity of the Perennial Ryegrass Fungal Endophyte *Neotyphodium lolii*. *Crop Sci* 48:1487–1501.
- West CP (2007) Plant influences on endophyte expression. *New Zealand*, pp 117–121
- Young CA, Felitti S, Shields K, et al (2006) A complex gene cluster for indole-diterpene biosynthesis in the grass endophyte *Neotyphodium lolii*. *Fungal Genet Biol* 43:679–693.
- Young CA, Tapper BA, May K, et al (2009) Indole-diterpene biosynthetic capability of epichloe endophytes as predicted by ltm gene analysis. *Appl Environ Microbiol* 75:2200–2211.
- Zhou Y (2014) *Neotyphodium lolii* endophyte improves drought tolerance in perennial ryegrass (*Lolium perenne*. L) through broadly adjusting its metabolism. Massey University, Manawatū, New Zealand

FIGURES AND TABLES

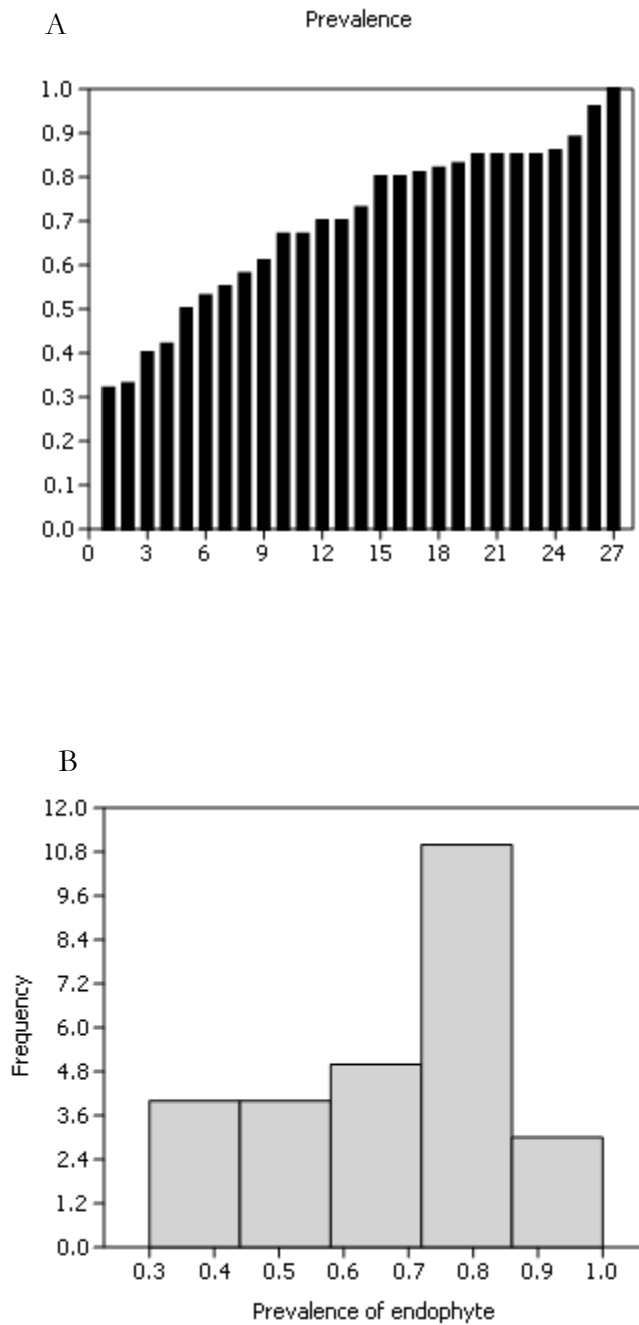


Figure 1- Distribution of endophyte prevalence in the 27 populations. A- Values of the prevalence for each of the 27 populations. B- Histogramm of the prevalence frequencies.

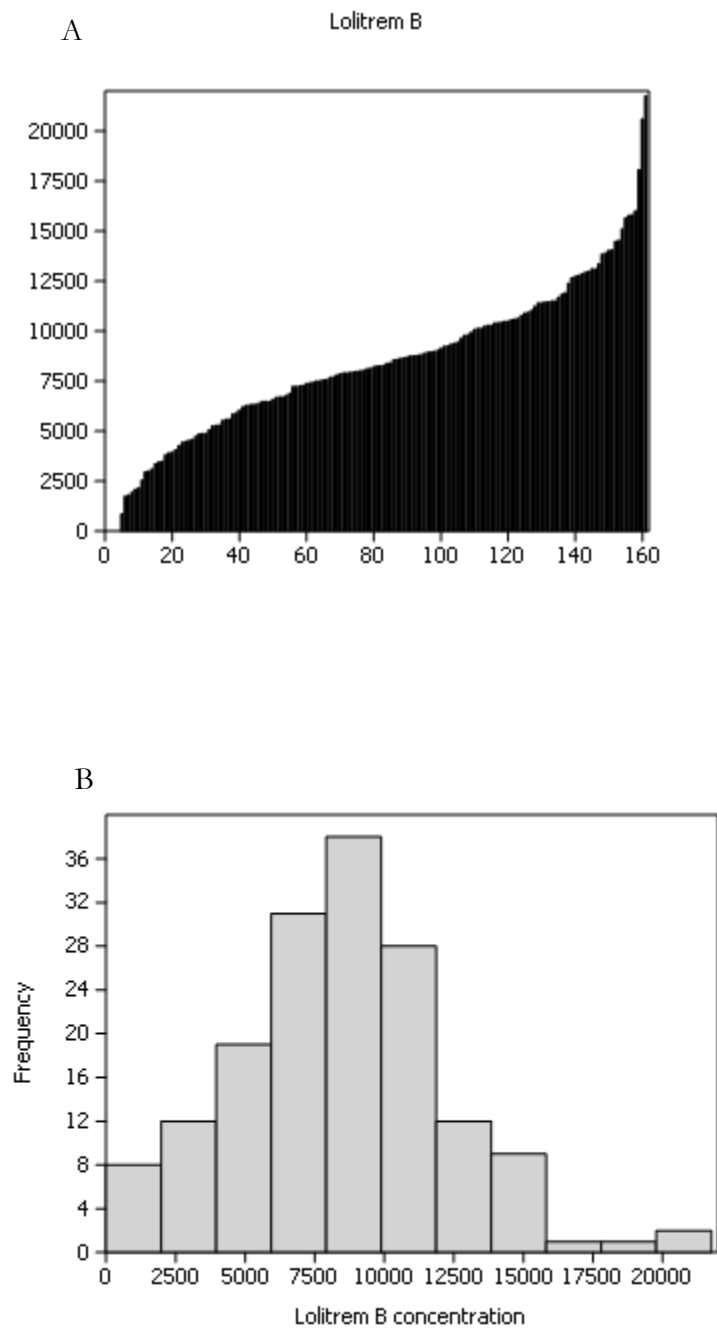


Figure 2- Distribution of lolitrem B concentrations among the 161 individuals endophyte-infected. A- Values of the lolitrem B concentration. B- Histogramm of the concentration frequencies.

Statistical tests on environmental variables.

A- Test for prevalence. Spearman' rs correlations and their p-values are indicated.

B- Test for genetic competence. The p-values of the Mann-Whitney tests are indicated.

C- Test for Lolitrem B expression. Spearman' rs correlations and their p-values are indicated.

See text for abbreviations.

Table1

A

	ALT	TMO	TMN	TMX	TAM	NJP	PTO	PJH	PJE	PDH	PDE	INS	PRA	Im	IEDM	QE	pH
Spearman' rs	-0,063007	0,23392	0,015761	0,42359	0,35975	-0,68338	-0,19333	-0,51148	-0,62906	0,17121	-0,27593	0,6127	0,73775	0,55377	-0,4981	-0,36509	0,45006
P-value	0,75488	0,24026	0,93781	0,027685	0,065312	8,53E-005	0,33394	0,0063934	0,00044	0,39319	0,16358	0,0006802	1,13E-005	0,0027292	0,0081919	0,061135	0,018495

B

	ALT	TMO	TMN	TMX	TAM	NJP	PTO	PJH	PJE	PDH	PDE	INS	PRA	Im	IEDM	QE	pH	PREV
Mann-Whitney (p-value)	5,46E-005	0,0005497	0,0001607	0,04994	0,5466	0,8926	0,07628	0,9967	0,829	0,05458	0,122	0,8728	0,04961	0,9121	0,7748	0,238	0,4815	0,08563

C

	ALT	TMO	TMN	TMX	TAM	NJP	PTO	PJH	PJE	PDH	PDE	INS	PRA	Im	IEDM	QE	pH	PREV
Spearman's rs	-0,28626	0,25409	-0,18311	0,22436	0,10044	-0,29456	-0,057355	-0,24745	-0,25567	0,24094	-0,14099	0,20578	0,31036	0,19552	-0,17085	-0,18912	0,011065	0,38552
P-value	0,00023203	0,001144	0,02007	0,0042212	0,20489	0,0001489	0,46988	0,0015523	0,0010629	0,0020776	0,07444	0,0088235	6,16E-005	0,012934	0,030238	0,016277	0,8892	4,41E-007

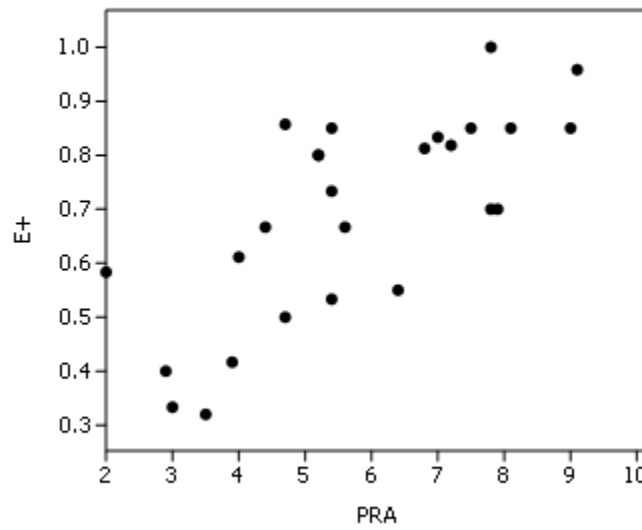


Figure 3- Relation between endophyte prevalence (E+) and PRA index (N=27, $r_s=0,73$, $p<10^{-4}$)

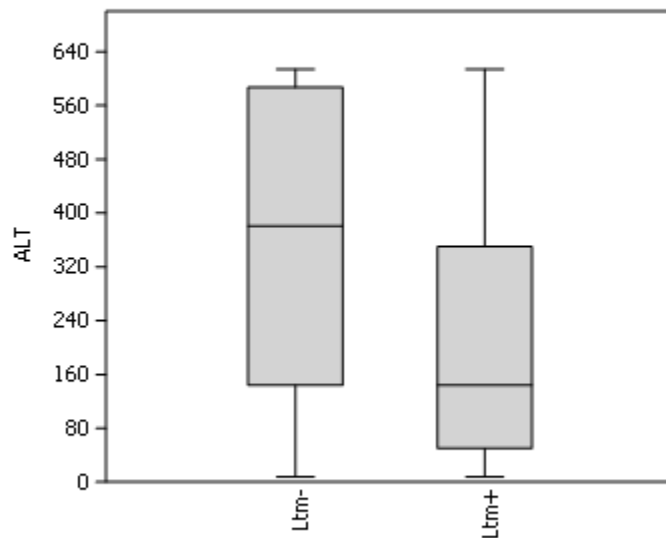


Figure 4- Box- plot of the variation of altitude (ALT, in m) between genetically non-competent (Ltm-) and competent (Ltm+) individuals. The median are significantly different ($p<10^{-4}$).

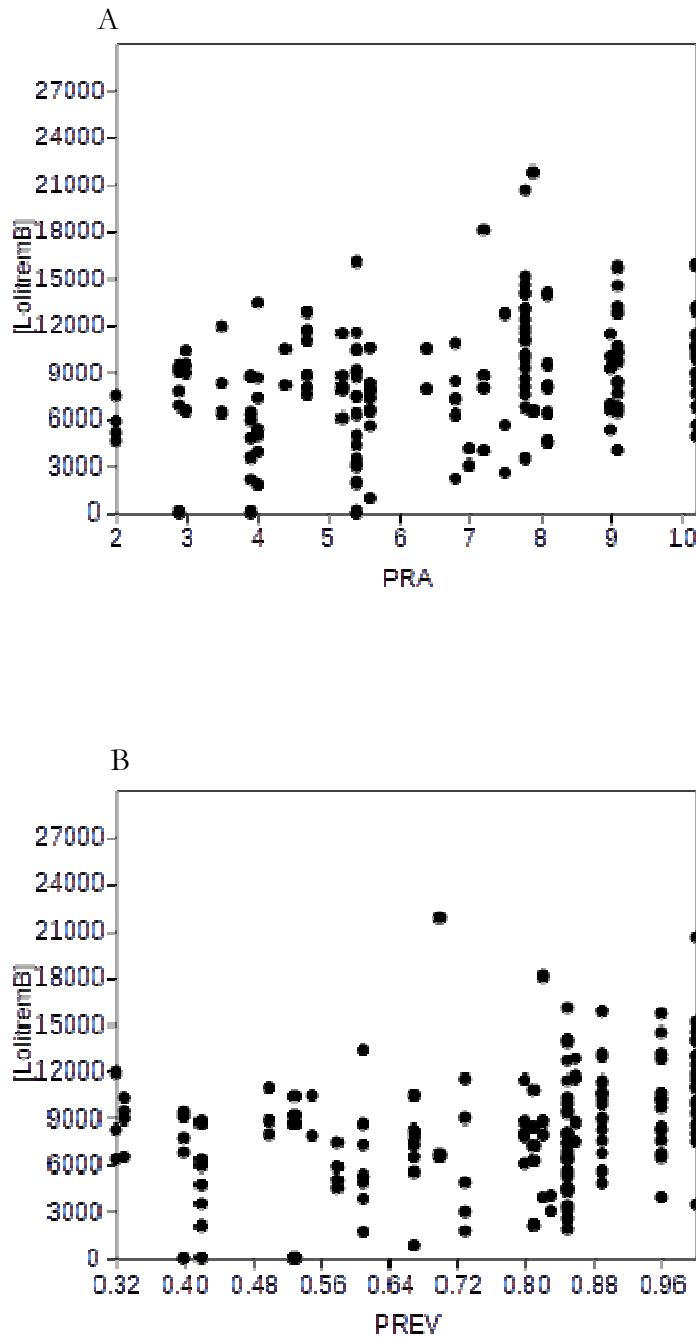


Figure 5- Relation of the concentration of lolitrem B ([LolitremB], in $\mu\text{g}/\text{kg}$) with PRA index (A) and endophyte prevalence (PREV) (B) in populations. The correlations are positively significant ($p < 10^{-4}$ and $p < 10^{-6}$, respectively).

Présentation de l'article 5

Le lolitrème B (LB) est une mycotoxine pouvant être synthétisée par *Epiclloë festucae* var. *lolii* (anciennement *Neotyphodium lolii*, Leuchtman et al., 2014) en symbiose avec *Lolium perenne* (Ray grass anglais, RGA). La consommation de RGA endophyté contenant du LB est connue pour entraîner des désordres neuromusculaires (« Ryegrass staggers »). Cette association peut également être à l'origine de la production d'ergovaline (EV), dont la toxicité est surtout documentée dans la Fétuque élevée. En effet, même si ces deux mycotoxines peuvent être produites dans le RGA endophyté, peu de données sont disponibles sur les teneurs en EV dans la plante. Une étude a été conduite en 2010 à Saint-Affrique (Aveyron) pour évaluer la toxicité du RGA sur « ovins laitiers » lors d'un affouragement en vert au printemps. Le fourrage utilisé dans cet essai était composé d'une variété de RGA appelé Samson réputé très toxigène et à l'origine de nombreux cas d'intoxications en Nouvelle-Zélande. En 2010, les doses réputées toxiques en LB n'ont pas été atteintes et aucune brebis n'a présenté de signe d'intoxication. Une hypothèse peut être formulée pour expliquer ce résultat : le protocole de distribution de l'herbe, après fauche aurait laissé au champ les parties toxiques (la fauche avait été réalisée à 8 cm, hauteur classique, toutefois, les effets toxiques observés au champ suggèrent une coupe rase de l'herbe par les animaux qui pâturent). Cette hypothèse nous a conduit à nous demander qu'elle était la répartition du LB dans les différentes parties consommable de la plante.

Par ailleurs la période de l'année pendant laquelle a eu lieu cet essai n'était peut-être pas celle pour laquelle la teneur en LB est maximale dans la plante. Cette hypothèse nous a conduit à analyser la variabilité saisonnière de production de LB. Certains facteurs abiotiques comme la lumière, la température, la disponibilité en eau influencent la croissance végétale mais également la synthèse de toxines (article 1, paragraphe « Facteurs extrinsèques », p.30). Nous avons donc profité des analyses précédentes pour rechercher la présence de corrélations entre certains facteurs agro-environnementaux, comme le cumul de pluies et de températures, et la teneur en LB.

De plus, bien que les données de la littérature rapportent la production d'EV par *E. festucae* var. *lolii*, sa teneur dans le RGA endophyté est rarement documentée. Cette observation nous a amené à effectuer le même type de suivi pour l'EV que pour le LB. Le protocole général réalisé est identique à celui présenté dans l'article 2 pour la FE (50).

Une parcelle de RGA endophyté réputé toxigène (cultivar Samson endophyté à 94% par *E. festucae var. lolii*) a été semée en 2009 à Saint-Affrique (Aveyron). Un apport en azote de 120 unité/ha a été effectué au printemps 2011. Les températures minimales et maximales et la pluviosité journalières ont été relevées dans les stations les plus proches. Le protocole de prélèvement mis en place était identique à celui de l'étude précédente sur la fétuque élevée (FE) (« Présentation de l'article 2 », p.43). Pendant 3 ans (de mars 2010 à juin 2012) des échantillons ont été récoltés toutes les semaines au printemps, puis tous les mois ou deux fois par mois en été, automne et hiver. A chaque prélèvement la plante entière (partie aérienne uniquement) a été collectée. Au printemps, à partir de l'épiaison (stade 51 de l'échelle de codification des stades phénologiques des monocotylédones, échelle BBCH) et jusqu'à maturation complète de la graine (stade 89, échelle BBCH) 3 prélèvements supplémentaires ont été effectués : la base, les feuilles et les épis (inflorescence) (« Présentation de l'article 2 », Figure 1, p.45). Cent grammes de matière fraîche ont été récolté pour chaque échantillon sur 5 points représentatifs de la parcelle (« Présentation de l'article 2 », Figure 2, p.46) séchés puis broyés. Le LB et l'EV ont été dosés par HPLC avec détecteur à fluorimétrie comme respectivement décrit dans l'article 3 et l'article 2.

Durant ces 3 années, les teneurs maximales en EV ont toujours été obtenues au stade de pleine maturité des graines (stade 89, échelle BBCH) soit 6 semaines après l'épiaison (stade 51, échelle BBCH) (figure 2A, article 5, p.102). Les maxima atteints étaient très différents d'une année sur l'autre variant de 526 à 2322 $\mu\text{g EV/kg}$ de matière sèche (MS) en 2010 et 2011. Deux autres pics de concentrations ont été observés, un fin septembre (377 $\mu\text{g EV/kg MS}$) correspondant aux **regains d'automne** (repousse végétale d'automne) et l'autre début janvier (216 $\mu\text{g EV/kg MS}$) correspondant à la **sénescence totale** de la plante. Chaque année la teneur en EV a varié fortement à partir de l'épiaison. L'analyse des différentes parties de la plante a mis en évidence que les teneurs maximales ont été mesurées dans l'inflorescence (épis) à maturation complète des graines (stade 89) (tableau 1, article 5, p.103) : 3933 et 6241 $\mu\text{g EV/kg MS}$ respectivement en 2012 et 2011. De plus à partir de la fin de la floraison les niveaux observés dans les épis se sont révélés près de 10 fois supérieurs à ceux des bases et des feuilles (tableau 1, article 5, p.103). De la même manière que dans la FE (article 2, p.50) ces résultats mettent en évidence que **le stade phénologique est un facteur clé dans la modulation des teneurs en EV dans le RGA** (Repussard et al., 2014b). Néanmoins les résultats concernant la plante entière, les bases et les feuilles ont mis en évidence qu'en 2011 l'accumulation de la

toxine était plus importante qu'en 2010 et 2012. Cela suggère que d'autres facteurs comme l'azote, les températures et la pluviosité sont capables de faire varier la production annuelle en toxine.

En 2011 un apport azoté conforme à la conduite classique de prairie temporaire a été effectué. L'analyse des teneurs en EV a mis en évidence que l'accumulation de cet alcaloïde était significativement plus élevée en 2011 qu'en 2010 et 2012 dans la plante entière (ANCOVA, respectivement $p=0,049$ et $p=0,003$) et qu'en 2012 pour les bases et les feuilles (ANCOVA, respectivement $p=0,001$ et $p=0,017$). **Ces résultats suggèrent que l'apport en azote a eu un effet sur l'accumulation de la toxine, en accord avec ce qui a été décrit pour la FE+** (Repussard et al., 2014b). Les données bibliographiques obtenues sur des RGA endophytés cultivés sous serre démontrent en revanche que d'importants apports azotés entraînent une baisse des niveaux en alcaloïdes dans la plante (Hunt et al., 2005 ; Rasmussen et al., 2007). L'impact de la température et de la pluviosité ont également été évalués. Les résultats obtenus ont mis en évidence une corrélation linéaire en 2010 et 2012 et une corrélation exponentielle en 2011 entre les teneurs en EV dans la plante entière et le cumul des températures (degrés-jours) à partir de 900°C cumulés (figure 4A, article 5, p.104). De manière intéressante, le nombre de degrés-jours nécessaire à l'augmentation de l'EV est identique à celui mis en évidence dans l'étude précédente concernant la FE (article 2, p.50). L'analyse statistique de ces données a révélé un effet important de la température sur l'EV (ANOVA deux facteurs, $p<0,001$) mais pas d'effet lié à l'année d'étude. **La température est un facteur abiotique fortement impliqué dans la production de l'EV dans le RGA.** Malgré les corrélations existantes entre les teneurs en EV et les précipitations aucun effet significatif de ce paramètre ou de l'année d'étude n'a pu être mis en évidence (ANOVA à 2 facteurs). Ce résultat n'est pas en accord avec une étude réalisée sous serre mettant en évidence une forte augmentation des teneurs en EV suite à un fort stress hydrique (Hahn et al., 2008). Néanmoins il est intéressant de noter qu'en 2011 les corrélations entre l'accumulation d'EV et les cumuls de températures et de pluviosité sont exponentielles et non linéaires comme pour 2010 et 2012. **Cela pourrait suggérer un effet cumulé des paramètres climatiques (températures, précipitations) et de l'apport en azote effectué cette année.**

La deuxième partie de cette étude concerne les analyses en LB. L'accumulation de la toxine dans la plante a été plus précoce que pour l'EV c'est-à-dire début mars au début de la reprise végétative. Les teneurs maximales ont été atteintes au stade de pleine maturité des

graines (stade 89 échelle BBCH) au mois de juin 2010, 2011 et 2012 (figure 2A, article 5, p.102). Ces maxima ont été similaires chaque année variant de 1296 à 1871 $\mu\text{g LB/kg MS}$ respectivement en 2012 et 2010. Un seul autre pic de concentration a été observé au milieu du mois d'octobre (819 $\mu\text{g LB/kg MS}$). La gamme de teneurs observées au cours de cet essai est inférieure à certaines décrites au champ en Australie (Reed et al., 2004). Néanmoins les niveaux maximum obtenus sur cet essai sont en accord avec certaines données obtenues au champ en France et en Allemagne sur différents écotypes de RGA (Durix et al., 1998 ; Oldenburg, 1997). Le deuxième pic de LB observé à l'automne apparait dans la littérature et il peut être d'intensité équivalente à celle de la production printanière.

Les teneurs en LB et en EV sont fortement corrélées (test de Pearson, $p < 0,0001$) durant les 3 années d'étude. Les concentrations en LB étaient environ 2 fois plus élevées que celles en EV (figure 3, article 5, p.102). Ces résultats sont en accord avec une étude australienne ayant mis en évidence dans des pâtures de deux écotypes de RGA des quantités de LB 1 à 2 fois supérieures à celles en EV (Reed et al., 2011). Des données européennes décrivent des teneurs en EV plus élevées que celles en LB (Bony et al., 2001b ; Oliveira et al., 2002). Alors que sur des pailles collectées en Orégon, les teneurs en LB étaient dix fois supérieures à celles en EV (Hovermale & Craig, 2001) **Toutes ces variations d'intensité et de moment de production maximale semblent être en partie sous l'influence de l'écotype du RGA, du stade de développement de la plante et des conditions environnementales du lieu de culture.** L'étude mise en place à Saint-Affrique a permis d'analyser l'influence du stade phénologique de la plante et des conditions de culture sur la synthèse de LB.

Comme pour l'EV l'analyse des différentes parties de la plante montre que les teneurs les plus élevées sont principalement mesurées dans les épis (tableau 1, article 5, p.103). Les concentrations maximales sont toujours obtenues à maturation complète des graines et ont varié entre 2392 et 3046 $\mu\text{g LB/kg MS}$ respectivement en 2011 et 2012. Lors de cette étude bien qu'aucune différence significative n'ait été observée pour le LB entre les 3 parties de la plantes testées, les niveaux en LB dans les épis sont 2 à 3 fois plus élevés que dans les bases et les feuilles à partir de la fin de la floraison. Comme il est décrit dans une étude au champ des quantités très importantes de LB sont produites dans les graines pouvant représenter jusqu'à 60% de la teneur totale dans la plante (Ball et al., 1997). Néanmoins les concentrations de cet alcaloïde retrouvées dans la base de la plante sont importantes pouvant être équivalentes à celles dans les épis. Ceci confirme les données de la littérature indiquant que des teneurs très

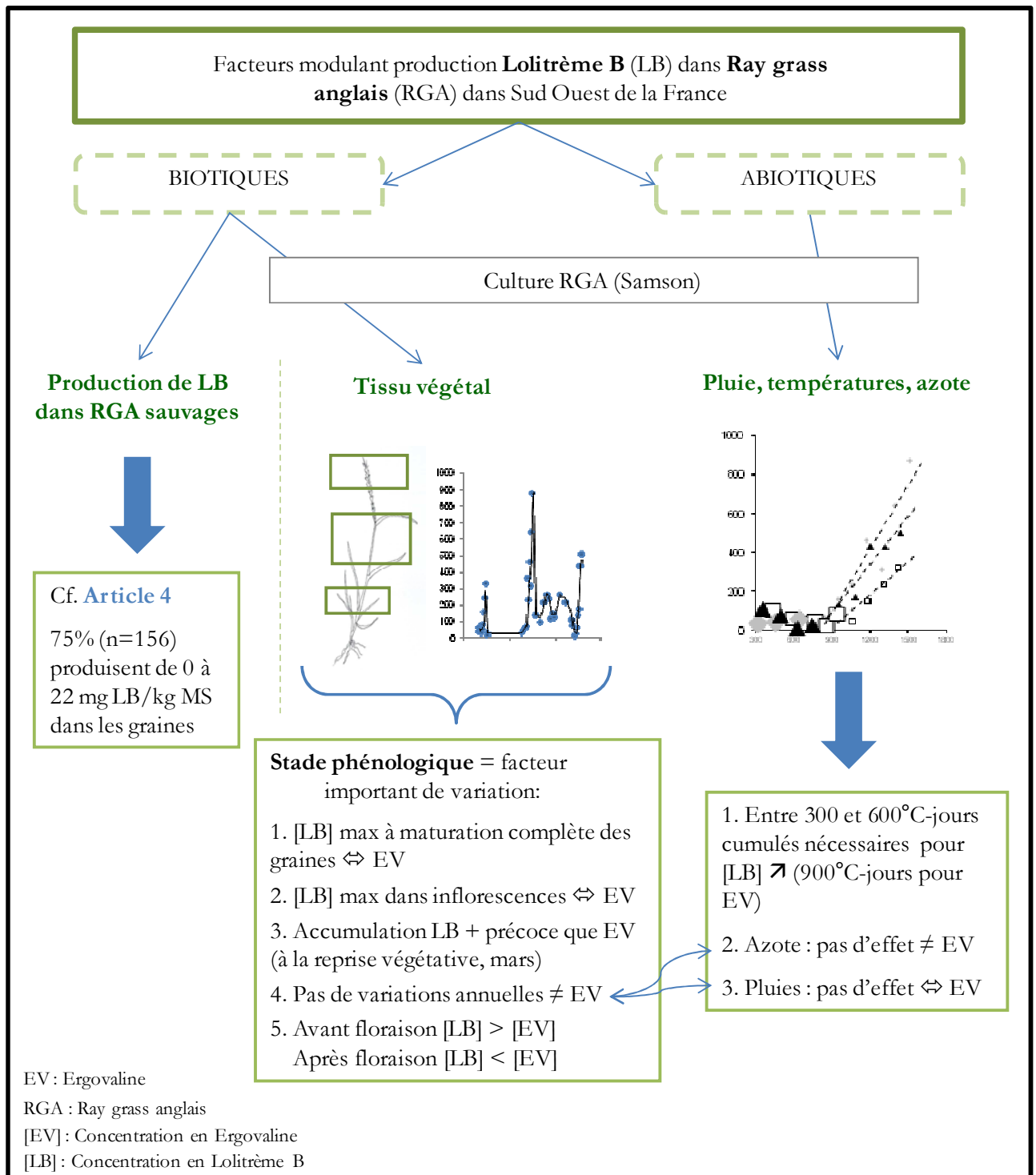
élevées voire les plus élevées en LB peuvent être retrouvées dans les tissus les plus âgés et sénescents, proches du talle (base de la plante). **Ces analyses ont mis en évidence que la maturité de la plante jouait un rôle important dans la variation des teneurs en LB.**

L'impact de l'azote, de la température et de la pluviosité sur la production de LB ont également été évalués. En 2010, 2011 et 2012 les teneurs en LB n'ont statistiquement pas différencié qu'elle que soit la partie de la plante envisagée. **Ces résultats sont en accord avec une étude sous serre ne démontrant aucun effet d'un apport azoté sur la production de LB** (Hunt et al., 2005). Les analyses des cumuls de températures (degrés-jours) et de précipitations ont pu mettre en évidence des résultats intéressants. Les concentrations en LB ont augmenté après un cumul de 600 degrés-jours en 2010 et 2011 (corrélation exponentielle) alors que 300 degrés-jour ont été suffisants en 2012 (figure 4B, article 5, p.104). La corrélation entre le cumul des degrés-jours et les teneurs en LB montre que ce paramètre climatique a eu un effet significatif (ANOVA 2 facteurs, $p < 0,001$) sur la production de cet alcaloïde, indépendamment de l'année d'étude. **Au champ, pendant la période de croissance de la plante (Février à Juin), le cumul des températures semble influencer sur la production de LB dans le RGA.** De la même manière les analyses effectuées sur la relation entre cumul de précipitations et teneurs en LB mettent en évidence des corrélations linéaires en 2011 et 2012 et exponentielle 2010 et un effet significatif de ce paramètre sur les concentrations en LB (ANOVA 2 facteurs, $p < 0,001$) indépendamment de l'année d'étude. Néanmoins l'année la plus sèche (2011) les teneurs en LB n'ont pas été plus élevées que les 2 autres années d'étude. L'effet significatif du cumul des précipitations n'est autre que la simple relation existant entre les quantités de pluies que l'on additionne et les teneurs en LB qui augmentent avec la croissance de la plante.

En conclusion cette étude sur le RGA « Samson » endophyte toxigène cultivé dans le Sud Ouest de la France a mis en évidence des niveaux de production en LB inférieurs aux doses réputées toxiques pour le bétail. Par contre des teneurs très élevées en EV ont été observées. **Comme pour l'étude sur FE, le stade de maturité de la plante est le principal facteur influençant la production d'EV et LB, les concentrations maximales étant observées à maturation complète des graines.** Les résultats obtenus au champ à Saint-Affrique sur le potentiel impact de l'azote, des températures et des précipitations sur les teneurs en alcaloïdes ont été délicats à comparer puisque la majorité des études disponibles dans la littérature concernent des essais sous serre c'est-à-dire en atmosphère contrôlée. Néanmoins les corrélations mises en évidence au cours de ce travail ont permis de conclure que **les teneurs en**

EV et LB dépendent des degrés-jours cumulés bien que les niveaux en LB augmentent avec un cumul de températures moins important que pour l'EV. **L'ensemble de ces résultats suggère que, dans cette étude, les températures, la pluviosité et l'azote n'ont pas le même impact sur la production de LB et d'EV dans le RGA endophyté.**

Encadré 5 : Etude des facteurs modulant la production de lolitrème B dans Ray grass anglais



Article 5

Ergovaline and Lolitrem B Concentrations in Perennial Ryegrass in Field Culture in Southern France: Distribution in the Plant and Impact of Climatic Factors

Repussard C., Zbib N., Tardieu D., and Guerre P.

Université de Toulouse, INP, ENVT, UR Mycotoxicologie, F-31076 Toulouse, France

Mots clés

Perennial ryegrass (*Lolium perenne*), fungal endophyte (*Epichloë festucae* var. *lolii*), Samson, ergovaline, lolitrem B, climatic factors, BBCH scale, temperatures, pluviometry

Article publié en 2014 dans Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 62 (52), 12707-12712.

Ergovaline and Lolitrem B Concentrations in Perennial Ryegrass in Field Culture in Southern France: Distribution in the Plant and Impact of Climatic Factors

Céline Repussard, Nasrallah Zbib, Didier Tardieu, and Philippe Guerre*

Université de Toulouse, INP, ENVT, UR Mycotoxicologie, F-31076 Toulouse, France

ABSTRACT: Perennial ryegrass (*Lolium perenne*) infected by *Epichloë festucae* var. *lolii* contains alkaloids that are responsible for toxicosis in several countries, but few cases are reported in Europe. Lolitrem B is generally the most abundant alkaloid and is recognized to be responsible for livestock staggers, whereas ergovaline is less frequently documented in perennial ryegrass. Lolitrem B and ergovaline were monitored over a three-year period in endophyte-infected perennial ryegrass 'Samson' sown in southern France. Alkaloid concentrations were strongly influenced by the stage of maturity of the plant; maximum concentrations were always measured at the fully ripe stage. Over the three years of analysis, variations in lolitrem B in the whole plant at the fully ripe stage were low (from 1296 to maximum 1871 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dry matter), whereas ergovaline varied considerably (from 526 to 2322 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dry matter), suggesting that abiotic factors play a key role in determining ergovaline levels in endophyte-infected perennial ryegrass.

KEYWORDS: perennial ryegrass (*Lolium perenne*), fungal endophyte (*Epichloë festucae* var. *lolii*), Samson, ergovaline, lolitrem B, climatic factors, BBCH scale, temperatures, pluviometry

INTRODUCTION

The symbiotic association of *Epichloë festucae* var. *lolii* (formerly named *Neotyphodium lolii*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne*) may lead to the production of alkaloids that are toxic for livestock. Lolitrem B, **1** (Figure 1), is the main alkaloid of

and sheep.^{1–3} However, its toxicity in endophyte-infected perennial ryegrass is less documented.⁴ Because staggers is common in Australia and New Zealand, grass/endophyte associations with strains of *Epichloë* that do not produce ergovaline and lolitrem B have been developed for the sowing of perennial ryegrass in the field.^{5,6} In Europe, despite the high levels of endophyte-infected perennial ryegrass found, signs of toxicity are rarely reported.^{1,7–10}

Analysis of genetic factors has demonstrated that some *E. festucae* var. *lolii* strains synthesize ergovaline alone, and others synthesize lolitrem B alone, but most produce variable concentrations of both toxins.^{7,11–18} The range of lolitrem B concentrations in the whole plant considerably varies, up to 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in the field in Australia and in the straw of endophyte-infected perennial ryegrass in Oregon.^{19,20} Ergovaline content also strongly varies, up to 2.5 mg/kg in the field in Australia and 0.5 mg/kg in the straw in Oregon.^{19,20} Interestingly, the origin of the perennial ryegrass ecotype influences lolitrem B and ergovaline in grass.^{21,22} However, comparison of German ecotypes and the New Zealand cultivars of endophyte-infected *L. perenne* has revealed that the environmental conditions during plant growth have a stronger influence on lolitrem B concentration than the origin of the ecotype.²¹ Surprisingly, little is known about the influence of abiotic factors on the levels of lolitrem B in field conditions, whereas the stage of maturity of the plant, nitrogen fertilization, and, to a lesser extent, temperature and drought are known to influence the level of ergovaline in endophyte-infected tall fescue.^{23–29} Studies conducted in Australia revealed that

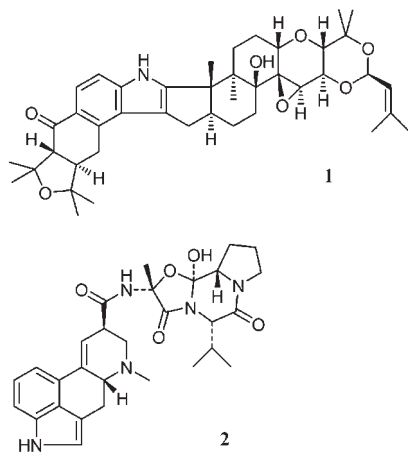


Figure 1. Structures of lolitrem B, **1**, and ergovaline, **2**.

the lolitrem group encountered in endophyte-infected perennial ryegrass. It is known to be responsible for staggers in several countries, and a toxic threshold of 1800–2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ has been established for cattle and sheep. Ergovaline, **2**, is the main alkaloid of the ergopeptine group and is also encountered in endophyte-infected perennial ryegrass. When present in endophyte-infected tall fescue, ergovaline leads to fescue toxicosis, with a toxic threshold of 300–400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in cattle

Received: September 22, 2014

Revised: December 10, 2014

Accepted: December 12, 2014

Published: December 12, 2014

concentrations of ergovaline and lolitrem B in endophyte-infected perennial ryegrass strongly varied with time, and the maxima were observed at different periods of the year.³⁰ High rainfall in spring–summer accompanied by dry warm conditions in late summer–autumn were observed in the years when severe outbreaks of toxicosis occurred.³¹

The purpose of this study was thus to investigate ergovaline and lolitrem B levels in the symbiotic association *E. festucae* var. *lolii*/*L. perenne*, which is known to produce high concentrations of alkaloids. Alkaloid levels were investigated in the leaves, base, and inflorescence. The stage of maturity of the plant and the temperature and rainfall over the three-year study of plant growth were investigated as factors responsible for variations in ergovaline and lolitrem B contents.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Pastures. Perennial ryegrass seeds *L. perenne* cv. ‘Grasslands Samson’ with a seedling infection rate of 70% measured using a Phytoscreen immunoblot kit (Agrinostics Ltd., Watkinsville, GA, USA) were obtained from RAGT 2n SAS (Rodez, France). Sowing (27 kg seeds/ha) was done in September 2009 after conventional soil preparation in Saint-Affrique (Aveyron, France). The plot (0.75 ha) slopes gently toward a small river, the soil is a sandy clay loam, red brown, little humus, with gravel and angular fragments of sandstone and mudstone of polyhedral structure. Each year the plot was mowed in June to avoid dissemination. Nitrogen fertilization was done in 2011 with urea (70 and 50 U/ha on March 9 and April 13, respectively). Rainfall was recorded at the Saint-Affrique site, whereas maximum and minimum daily air temperatures were measured at the Montlaur site (9 km from Saint-Affrique). The Biologische Bundesanstalt Bundessortenamt and Chemische Industrie (BBCH) scale was used to monitor the perennial ryegrass growth.³² Cumulative degree-days (average daily temperature above 0 °C) was calculated from February to mowing.^{33,34}

Plant Material. Levels of ergovaline and lolitrem B were measured once a week from April to June and once or twice a month the rest of the year. Whole plants, cut just above the ground, were collected on each sampling occasion, whereas inflorescence (after heading), leaves (stem and leaf blade), and base (stem and leaf sheath) were collected from the heading stage to the fully ripe stage. On each sampling occasion, five samples of around 100 g of fresh material were harvested to be representative of the plot. Samples were dried for 24 h at 60 °C in a ventilated oven and then ground to 0.5 mm in a Cyclotech 1093 grinding mill (Foss, Hogande, Sweden). The ground material was pooled and stored at room temperature until analysis.

Ergovaline and Lolitrem B Analysis. All reagents and chemicals, HPLC grade, were from Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, USA). Ergovaline standard was kindly provided by G. E. Rottinghaus (College of Veterinary Medicine, University of Missouri). Lolitrem B standard was purchased from AgResearch Limited Ruakura Research Centre (Hamilton, New Zealand). Ergovaline and lolitrem B concentrations were detected by fluorescence after purification on homemade Ergosil columns and HPLC separation according to the methods of Rottinghaus et al.²⁴ and Gallagher et al.³⁶ with slight modifications.^{23,35} Percentage recovery was 83% for ergovaline and 86% for lolitrem B. The limits of quantitation were 20 and 50 µg/kg of dry matter (DM) for ergovaline and lolitrem B, respectively.

Statistical Analysis. Statistical analysis was performed using R version 2.11.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Comparison of ergovaline and lolitrem B levels in plants depending on the year of analysis was done using one-way ANOVA. The slopes of accumulation of the alkaloids in the base, leaves, and inflorescence plotted according to the BBCH stage were compared using ANCOVA. Correlation between ergovaline and lolitrem B concentrations in whole plant across the three years of study was analyzed using Pearson’s test. Two-way ANOVA was used to reveal the effects of year of analysis (factor 1) and cumulative degree-days or cumulative rainfall (factor 2) on ergovaline and lolitrem B

concentrations (dependent variable). Pearson’s test was used to reveal correlations between cumulative degree-days or cumulative rainfall and ergovaline or lolitrem B concentrations in whole plant.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of Time. Perennial ryegrass (*L. perenne*) infected with *E. festucae* var. *lolii* contains ergovaline and lolitrem B that are toxic for livestock (Figure 1). Samson cultivar was used because no endophyte-infected perennial ryegrass was commercialized in France. The ergovaline and lolitrem B concentrations measured in the seeds sown in the experimental pasture were 8950 and 5100 µg/kg DM, respectively. These levels were within the ranges of those observed in wild perennial ryegrass.⁷ Ergovaline and lolitrem B concentrations in whole plants were monitored from April 2010 to June 2012 (Figure 2). The ergovaline level increased from the middle of heading (weeks 20, 70, and 124 in 2010, 2011, and 2012, respectively) to reach its maximum at the fully ripe stage, 5 weeks later. Maximum values varied considerably with the year, with mean concentrations at mowing of 526, 2322, and 604 µg ergovaline/kg DM, in 2010, 2011, and 2012, respectively. Two other ergovaline peaks of 377 and 216 µg/kg DM were observed at the end of September 2011 (week 91) and at the beginning of January 2012 (week 105), respectively. Between-years comparison of ergovaline from the beginning of grass growth to the emergence of the inflorescence (from February to April) revealed no significant difference (ANOVA). The mean concentration of ergovaline was 35 ± 21 µg/kg DM. By contrast, comparison of the level of ergovaline from the emergence of the inflorescence to the fully ripe stage (from May to June) revealed significant differences between years. Ergovaline was higher in 2011 than in 2010 and 2012 (ANCOVA, $P = 0.049$ and 0.003 , respectively), but did not differ between 2010 and 2012.

Concentrations of lolitrem B in the whole plant increased earlier, at the beginning of March, but maximum levels were also reached at the fully ripe stage. Only slight differences between years were observed at the fully ripe stage, with mean concentrations of 1871, 1500, and 1296 µg lolitrem B/kg DM, in 2010, 2011, and 2012, respectively. Only one other peak of lolitrem B was observed in the middle of October (week 93/94) with a mean lolitrem B level of 819 µg/kg DM. A between-year comparison of the level of lolitrem B in the whole plant from February to June revealed no significant difference.

Vegetative stage is a main factor to take into consideration when ergovaline contents in whole plant are compared. The highest contents measured in tall fescue in France were observed at the fully ripe stage, and two other peak ergovaline concentrations were measured in fall and winter.²³ Studies in perennial ryegrass showed peak ergovaline concentrations in spring during flowering.^{4,22,37–39} Another peak of ergovaline has also been reported in the fall, sometimes higher than the value observed in the spring.^{4,22,38,39} In Australia, the maximum ergovaline concentration in ryegrass pastures was observed in March, which corresponds to fall in the northern hemisphere.^{19,30} Differences in when peak ergovaline concentrations were observed can be explained by the hemisphere in which the study was conducted and also by climate, which can affect plant maturation. The peak of ergovaline observed in the fall corresponded to plant regrowth (“regain”), whereas the peak observed in winter corresponded to the maximum senescence of the plant.

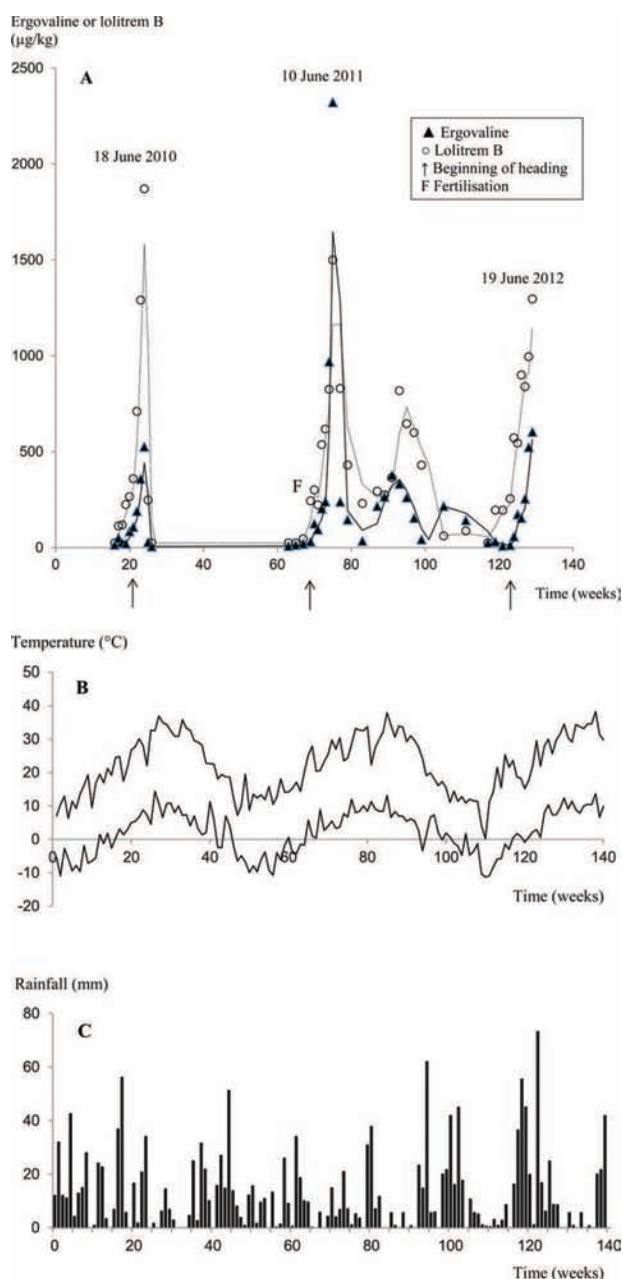


Figure 2. Ergovaline (solid line) and lolitrem B (dashed line) concentrations in whole endophyte-infected perennial Samson ryegrass sown in September 2009 in Saint-Affrique (Aveyron, France) according to (A) the week of measurement, (B) the minimum and maximum temperatures, and (C) the cumulative rainfall per week. Week 1 corresponds to the first week in the year 2010.

The range of lolitrem B concentrations in the whole plant was smaller than the range observed in the field in Australia.^{19,31} The concentration of lolitrem B generally paralleled the concentration of ergovaline in terms of seasonal accumulation patterns. This observation is in agreement with data from Australia and New Zealand, even if peak concentrations were not observed at the same period of the year.^{19,31,38} In this study the highest concentration of lolitrem B was observed at the fully ripe stage, in agreement with data obtained in Germany and France, at least in some ecotypes.^{21,22}

In other ecotypes in France, Germany, and New Zealand, the highest lolitrem B level was observed later, in October in Europe and in January/February in New Zealand.^{21,22,38–40} Finally, the peak lolitrem B concentration observed in the fall appeared to vary in intensity and was sometimes higher than the concentration observed in the spring.^{4,22,38} The toxic threshold of lolitrem B in livestock ranges from 1800 to 2000 $\mu\text{g/kg}$ depending on the species.^{2,3} In this study, this level was reached only one time, at week 24 in 2010. There is no toxic threshold of ergovaline in endophyte-infected perennial ryegrass, but a toxic threshold of 300–400 $\mu\text{g/kg}$ was reported in endophyte-infected tall fescue.^{2,3} This concentration in whole plant was reached at weeks 23–24, 74–75, 91–93, and 128–129.

Relationship between Ergovaline and Lolitrem B Concentrations. Correlation between lolitrem B and ergovaline concentrations in the whole plant across the three years of study was investigated (Figure 3). The correlation between the

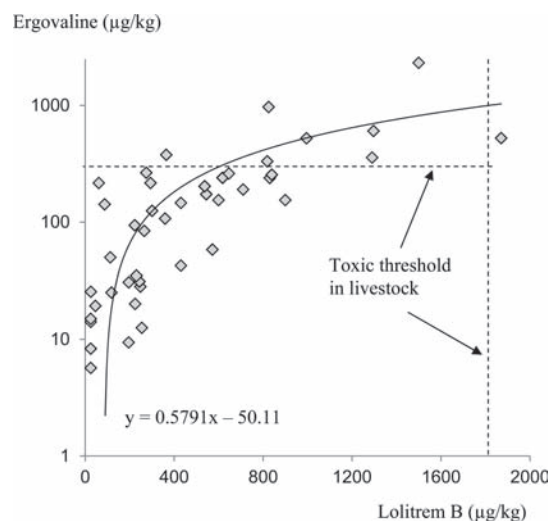


Figure 3. Correlation between ergovaline and lolitrem B concentrations in whole endophyte-infected perennial Samson ryegrass sown in September 2009 in Saint-Affrique (Aveyron, France) from April 2010 to June 2012.

two variables was high (Pearson's test, $P < 0.0001$), lolitrem B level in whole plant being around 2-fold higher than ergovaline. The lolitrem B to ergovaline ratio of concentration has interest with regard to the respective threshold of toxicity of these compounds in livestock.^{2,3} Studies conducted in endophyte-infected ryegrass straw in Oregon have shown that the concentration of lolitrem B was around 10-fold higher than that of ergovaline.²⁰ By contrast, a study conducted over 6 months on pastures in two ecotypes of endophyte-infected perennial ryegrass in Australia revealed that the concentration of lolitrem B was 1–2-fold higher than the concentration of ergovaline.³⁰ In Europe, higher ergovaline levels than lolitrem B levels have previously been reported in endophyte-infected ryegrass.^{7,11} The origin of the ecotypes explains in part the differences in the respective concentrations of ergovaline and lolitrem B observed, some ecotypes being able to produce high ergovaline level in plants, whereas others were unable.²² Also, the culture of New Zealand cultivar of endophyte-infected *L. perenne* under German conditions revealed that the environ-

Table 1. Ergovaline and Lolitrem B Concentrations ($\mu\text{g}/\text{kg DM}$) in Endophyte-Infected Perennial Samson Ryegrass from Heading Stage to Fully Ripe Stage

weeks ^b	stage	BBCH	ergovaline ^a			lolitrem B ^a		
			B	L	I	B	L	I
69	beginning of heading	51	14	8	42	354	11	96
70	middle of heading	55	160	77	316	588	26	322
71	80% of inflorescence emerged	58	130	11	233	961	11	517
72	beginning of flowering	61	178	148	377	793	366	667
73	end of flowering	69	191	106	906	988	454	821
74	late milk	77	327	366	4521	1029	733	1788
75	fully ripe	89	362	296	6241	1383	592	2392
123	beginning of heading	51	17	15		605	38	
124	middle of heading	55	26	45	253	887	230	70
125	80% of inflorescence emerged	58	17	31	218	628	196	725
126	beginning of flowering	61	75	44	463	766	234	1393
127	end of flowering	69	49	44	555	841	483	1445
128	late milk	77	86	127	1549	1147	720	1871
129	fully ripe	89	33	48	3933	777	652	3046

^aB, base; L, leaves; I, inflorescence. ^bWeek 69 of study began on April 25, 2011, and week 123 of study began on May 7, 2012.

mental conditions during plant growth have a strong influence on lolitrem B concentration.²¹

Distribution within the Plant. In 2011 and 2012 the ergovaline and lolitrem B levels were measured in the base, leaves, and inflorescence (Table 1). From the heading stage to the fully ripe stage, the highest concentrations of the toxin were always observed in the inflorescence at the fully ripe stage. Whatever the part of the plant analyzed, the levels of the toxin at the fully ripe stage did not appear to be linked to those observed at the beginning of heading. A comparison of the slope of ergovaline accumulation revealed variations in bases and leaves depending on the year (ANCOVA, $P = 0.001$ and 0.017 , respectively), whereas no significant difference was observed in the inflorescences. By contrast, no significant difference between years was observed in the level of lolitrem B, whatever the part on the plant analyzed. From the middle of heading to the fully ripe stage (weeks 70 and 124 and weeks 75 and 129, respectively), the levels of ergovaline in bases ranged from 160 to 362 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in 2011 and from 26 to 33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in 2012. During the same period of time, the levels of ergovaline in inflorescences ranged from 316 to 6241 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and from 253 to 3933 $\mu\text{g}/\text{kg}$. This result demonstrates that ergovaline accumulates in the inflorescence of perennial ryegrass, as it does in the inflorescences of endophyte-infected tall fescue.²³ At the same stage of plant maturity, the concentrations of lolitrem B in bases ranged from 588 to 1383 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in 2011 (weeks 70 and 74, respectively) and from 887 to 1147 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in 2012 (weeks 124 and 128, respectively). In the inflorescences, lolitrem B ranged from 322 to 2392 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in 2011 (weeks 70 and 129, respectively) and from 725 to 3046 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in 2012 (weeks 124 and 129, respectively). This suggests that, even if the inflorescences are highly contaminated by lolitrem B, its accumulation in bases is stronger than that of ergovaline, in agreement with data demonstrating that lolitrem B accumulates in the oldest leaves, which is not the case for ergovaline.^{18,41} In the present study in 2011, nitrogen fertilization conformed to the usual recommendations for this kind of pasture.⁴² Comparison of alkaloids in the different parts of the plant revealed that the ergovaline level was significantly higher in 2011, with fertilization, than in 2012 without fertilization. By contrast, no difference was observed in the level of lolitrem B. Although factors other than nitrogen input in the pasture could

explain these differences, the increase in ergovaline content after fertilization agrees with previous data obtained on endophyte-infected tall fescue.^{23–25} Data concerning the effect of fertilization on alkaloid contents in endophyte-infected ryegrass are less numerous. Most data were obtained under controlled conditions, with high nitrogen input that led to a decrease in the level of endophyte in the plant. In these conditions, fertilization decreased alkaloid contents.^{43,44}

Climatic Factors. The concentrations of ergovaline and lolitrem B in the whole plant were plotted as a function of cumulative degree-days measured each year, from February to the ripe stage (Figure 4). When cumulative degree-days were below 900 °C, the concentration of ergovaline was low and did not differ between years (Figure 4A). By contrast, the concentration of ergovaline increased when cumulative degree-days exceeded 900 °C. This increase was linear in the years 2010 and 2012, but exponential in 2011. Two-way ANOVA revealed a strong effect of cumulative degree-days on the ergovaline level ($P < 0.001$), whereas the effect of the year was not significant. Correlation between the cumulative degree-days and the ergovaline content across all three years was highly significant (Pearson's test, $P = 0.00015$). This result agrees with what was observed in endophyte-infected tall fescue; cumulative degree-days higher than 900 °C were also necessary to increase ergovaline content.²³ The concentration of lolitrem B in the whole plant also correlates with cumulative degree days across all three years of study (Pearson's test, $P < 0.0001$). Two-way ANOVA revealed a significant effect of cumulative degree-days on lolitrem B level ($P < 0.001$), whereas the effect of year was not significant. The cumulative degree-days necessary to observe an increase of lolitrem B concentration in whole plant ranged from 300 to 600 °C (Figure 4B).

The cumulative rainfall per week from the beginning of February to the ripe stage was 326, 172, and 329 mm in 2010, 2011, and 2012, respectively (Figure 2C). Comparison of rainfall showed that 2011 was the driest (ANOVA, $P = 0.006$), whereas 2010 and 2012 did not differ. Two-way ANOVA revealed no significant effect of cumulative rainfall or of the year of analysis on the ergovaline level. Also, correlation between the cumulative rainfall and the ergovaline content across the three years from the beginning of February to the ripe stage was not significant (Pearson's test). This result agrees with what was

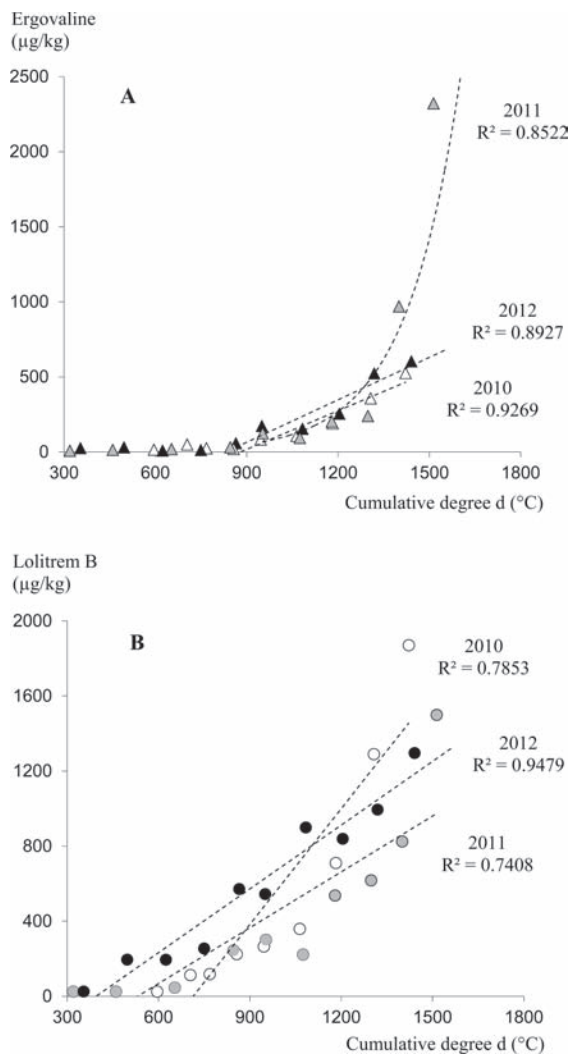


Figure 4. Plot of the concentrations of ergovaline (A) and lolitrem B (B) observed in whole endophyte-infected perennial Samson ryegrass from the beginning of February to the fully ripe stage over three years of culture according to the cumulative degree-days.

observed on endophyte-infected tall fescue.²³ By contrast, two-way ANOVA revealed a significant effect of cumulative rainfall on the lolitrem B level ($P < 0.001$), whereas the year of measure had no effect. Correlation between the cumulative rainfall and the lolitrem B level was highly significant (Pearson's test, $P = 0.0001$). Interestingly, outbreaks of perennial ryegrass toxicosis were observed in Australia when high rainfall was observed in spring–summer, but the concentrations of lolitrem B in the whole plant was not greater than the one recorded in earlier season.³¹

In conclusion, measurement of ergovaline and lolitrem B contents in endophyte-infected Samson perennial ryegrass sown in southern France revealed that the lolitrem B levels in whole plant were lower than those required to produce staggers in livestock, whereas high ergovaline concentrations were observed. Analysis of the factors influencing alkaloid concentrations revealed that the stage of maturity of the plant is a determining factor, with the highest levels observed at the fully ripe stage. Over the three year study period, concentrations of lolitrem B did not vary with year, whereas concentrations of

ergovaline varied significantly. Positive correlations were observed between cumulative degree-days and ergovaline and lolitrem B concentrations, with an increase in lolitrem B in the whole plant at lower temperatures than ergovaline. Taken together, these results suggest that abiotic factors do not have the same influence on the levels of ergovaline as on lolitrem B in endophyte-infected ryegrass sown in southern France.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(P.G.) E-mail: p.guerre@envt.fr. Fax: +335 61 19 32 40. Phone: +335 61 19 32 17.

Funding

This study was supported by the French government (Fond Unique Interministériel, Project 082906510) and the region Midi-Pyrénées in the framework of a project qualified by the French Competitiveness Cluster AGRIMIP-INNOVATION.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ABBREVIATIONS USED

RAGT, Rouergue Auvergne Gévaudan Tarnais; BBCH, Biologische Bundesanstalt Bundessortenamt and Chemische Industrie; DM, dry matter

■ REFERENCES

- (1) Repussard, C.; Zbib, N.; Tardieu, D.; Guerre, P. Les champignons endophytes du genre *Neotyphodium* et leurs toxines: généralités et problématique française. *Rev. Med. Vet.* **2013**, *164*, 583–606.
- (2) Zbib, N.; Repussard, C.; Tardieu, D.; Guerre, P. Toxicité des mycotoxines produites par des champignons endophytes du genre *Neotyphodium*. *Rev. Med. Vet.* **2014**, *165*, 116–135.
- (3) Tor-Agbidye, J.; Blythe, L. L.; Craig, A. M. Correlation of endophyte toxins (ergovaline and lolitrem B) with clinical disease: fescue foot and perennial ryegrass staggers. *Vet. Hum. Toxicol.* **2001**, *43*, 140–146.
- (4) Easton, H. S.; Lane, G. A.; Tapper, B. A.; Keogh, R. G.; Cooper, B. M.; Blackwell, M.; Anderson, M.; Fletcher, L. R. Ryegrass endophyte-related heat stress in cattle. *Proc. N. Z. Grassl. Assoc.* **1996**, *57*, 37–41.
- (5) Bouton, J. H.; Latch, G.; Hill, N. S.; Hoveland, C. S.; McCann, M. A.; Watson, R. H.; Parish, J. A.; Hawkins, L. L.; Thompson, F. N. Reinfestation of tall fescue cultivars with non-ergot alkaloid-producing endophytes. *Agron. J.* **2002**, *94*, S67–S74.
- (6) Hopkins, A. A.; Young, C. A.; Panaccione, D. G.; Simpson, W. R.; Mittal, S.; Bouton, J. H. Agronomic performance and lamb health among several tall fescue novel endophyte combinations in the South-Central USA. *Crop Sci.* **2010**, *50*, 1552.
- (7) Oliveira, J. A.; Rottinghaus, G. E.; Prego, C.; González, A. Contenido en alcaloides en semillas de poblaciones naturales de raigrás inglés del norte de España infectadas con los hongos endofitos *Neotyphodium*. *Invest. Agric. Prod. Prot. Veg.* **2002**, *17*, 247–256.
- (8) Bony, S.; Collin, E.; Perret Du Cray, G.; Ravel, C.; Delatour, P. Endophyte toxicosis: observations on an outbreak of ryegrass staggers in a dairy cow herd in France. *Rev. Med. Vet.* **1998**, *149*, 628.
- (9) Benkhelil, A.; Grancher, D.; Giraud, N.; Bezille, P.; Bony, S. Intoxication par des toxines de champignons endophytes chez des taureaux reproducteurs. *Rev. Med. Vet.* **2004**, *156*, 243–247.
- (10) Bony, S.; Emile, J. C.; Durix, A.; Ravel, C.; Guillaumin, J. J.; Guesquiere, M. Incidences des toxines de champignons endophytes des graminées sur les herbivores en conditions européennes. *Rech. Ruminants* **2001**, *8*, 149–152.
- (11) Bony, S.; Pichon, N.; Ravel, C.; Durix, A.; Balfourier, F.; Guillaumin, J. J. The relationship between mycotoxin synthesis and isolate morphology in fungal endophytes of *Lolium perenne*. *New Phytol.* **2001**, *152*, 125–137.

- (12) Bush, L. P.; Wilkinson, H. H.; Scharld, C. L. Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiol.* **1997**, *114*, 1–7.
- (13) Easton, H. S.; Latch, G. C. M.; Tapper, B. A.; Ball, O.-P. Ryegrass host genetic control of concentrations of endophyte-derived alkaloids. *Crop Sci.* **2002**, *42*, 51–57.
- (14) Hahn, H.; McManus, M. T.; Warnstorff, K.; Monahan, B. J.; Young, C. A.; Davies, E.; Tapper, B. A.; Scott, B. *Neotyphodium* fungal endophytes confer physiological protection to perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) subjected to a water deficit. *Environ. Exp. Bot.* **2008**, *63*, 183–199.
- (15) Leuchtmann, A.; Schmidt, D.; Bush, L. P. Different levels of protective alkaloids in grasses with stroma-forming and seed-transmitted *Epichloë/Neotyphodium* endophytes. *J. Chem. Ecol.* **2000**, *26*, 1025–1036.
- (16) Scharld, C. L.; Young, C. A.; Faulkner, J. R.; Florea, S.; Pan, J. Chemotypic diversity of epichloae, fungal symbionts of grasses. *Fungal Ecol.* **2012**, *5*, 331–344.
- (17) Siegel, M. R.; Latch, G. C. M.; Bush, L. P.; Fannin, F. F.; Rowan, D. D.; Tapper, B. A.; Bacon, C. W.; Johnson, M. C. Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response. *J. Chem. Ecol.* **1990**, *16*, 3301–3315.
- (18) Spiering, M. J.; Lane, G. A.; Christensen, M. J.; Schmid, J. Distribution of the fungal endophyte *Neotyphodium lolii* is not a major determinant of the distribution of fungal alkaloids in *Lolium perenne* plants. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 195–202.
- (19) Reed, K. F. M.; Walsh, J. R.; Cross, P. A.; McFarlane, N. M.; Sprague, M. A. Ryegrass endophyte (*Neotyphodium lolii*) alkaloids and mineral concentrations in perennial ryegrass (*Lolium perenne*) from southwest Victorian pasture. *Aust. J. Exp. Agric.* **2004**, *44*, 1185–1194.
- (20) Hovermale, J. T.; Craig, A. M. Correlation of ergovaline and lolitrem B levels in endophyte-infected perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *J. Vet. Diagn. Invest.* **2001**, *13*, 323–327.
- (21) Oldenburg, E. Endophytic fungi and alkaloid production in perennial ryegrass in Germany. *Grass Forage Sci.* **1997**, *52*, 425–431.
- (22) Durix, A.; Bony, S.; Ravel, C.; Balfourier, F.; Guillaumin, J. J.; Guesquière, M.; Chosson, J. F.; Charmet, G. The influence of toxic *Neotyphodium* endophyte on perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Rev. Med. Vet.* **1998**, *6*, 528.
- (23) Repussard, C.; Zbib, N.; Tardieu, D.; Guerre, P. Endophyte infection of tall fescue and the impact of climatic factors on ergovaline concentrations in field crops cultivated in southern France. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 9609–9614.
- (24) Rottinghaus, G. E.; Garner, G. B.; Cornell, C. N.; Ellis, J. L. HPLC method for quantitating ergovaline in endophyte-infested tall fescue: seasonal variation of ergovaline levels in stems with leaf sheaths, leaf blades, and seed heads. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 112–115.
- (25) Lyons, P. C.; Plattner, R. D.; Bacon, C. W. Occurrence of peptide and clavine ergot alkaloids in tall fescue grass. *Science* **1986**, *232*, 487–489.
- (26) Belesky, D. P.; Stuedemann, J. A.; Plattner, R. D.; Wilkinson, S. R. Ergopeptide alkaloids in grazed tall fescue. *Agron. J.* **1988**, *80*, 209.
- (27) Welty, R. E.; Craig, A. M.; Azevedo, M. D. Variability of ergovaline in seeds and straw and endophyte infection in seeds among endophyte-infected genotypes of tall fescue. *Plant Dis.* **1994**, *78*, 845–849.
- (28) TePaske, M. R.; Powell, R. G.; Clement, S. L. Analyses of selected endophyte-infected grasses for the presence of loline-type and ergot-type alkaloids. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 2299–2303.
- (29) Arechavaleta, M.; Bacon, C. W.; Plattner, R. D.; Hoveland, C. S.; Radcliffe, D. E. Accumulation of ergopeptide alkaloids in symbiotic tall fescue grown under deficits of soil water and nitrogen fertilizer. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 857–861.
- (30) Reed, K. F. M.; Nie, Z. N.; Walker, L. V.; Kearney, G. Fluctuations in the concentration of ergovaline and lolium B produced by the wild-type endophyte (*Neotyphodium lolii*) in perennial ryegrass (*Lolium perenne*) pasture. *Anim. Prod. Sci.* **2011**, *51*, 1098–1108.
- (31) Reed, K. F. M.; Nie, Z. N.; Walker, L. V.; Mace, W. J.; Clark, S. G. Weather and pasture characteristics associated with outbreaks of perennial ryegrass toxicosis in southern Australia. *Anim. Prod. Sci.* **2011**, *51*, 738–752.
- (32) Hess, M.; Barralis, G.; Bleiholder, H.; Buhr, L.; Eggers, T. H.; Hack, H.; Stauss, R. Use of the extended BBCH scale – general for the descriptions of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. *Weed Res.* **1997**, *37*, 433–441.
- (33) Duru, M.; Cruz, P.; Theau, J. P. Un modèle générique de digestibilité des graminées des prairies semées et permanentes pour raisonner les pratiques agricoles. *Fourrages* **2008**, *193*, 79–102.
- (34) Duru, M.; Cruz, P.; Martin, G.; Theau, J. P.; Charron-Moirez, M. H.; Desange, M.; Jouany, C.; Zerourou, A. Herb'sim: un modèle pour raisonner la production et l'utilisation de l'herbe. *Fourrages* **2010**, *201*, 37–46.
- (35) Repussard, C.; Tardieu, D.; Alberich, M.; Guerre, P. A new method for the determination of lolitrem B in plant materials. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2014**, *193*, 141–147.
- (36) Gallagher, R. T.; Hawkes, A. D.; Stewart, J. M. Rapid determination of the neurotoxin lolitrem B in perennial ryegrass by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr., A* **1985**, *321*, 217–226.
- (37) Cagaš, B.; Flieger, M.; Olšovská, J. Concentration of ergot alkaloids in Czech ecotypes of *Lolium perenne* and *Festuca pratensis*. *Grass Forage Sci.* **1999**, *54*, 365–370.
- (38) Watson, R. H. *Endophytic Perennial Ryegrass and Reproductive Performance of the Ewe*. Ph.D. thesis, Massey University: Palmerston North, New Zealand, 2000; pp 448.
- (39) Eerens, J. P. J.; Lucas, R. J.; Easton, H. S.; White, J. G. H. Influence of the ryegrass endophyte (*Neotyphodium lolii*) in a cool moist environment. I. Pasture production. *N. Z. J. Agric. Res.* **1998**, *41*, 39–48.
- (40) Ball, O. J.; Prestidge, R. A.; Sprosen, J. M. Interrelationships between *Acremonium lolii*, peramine, and lolitrem B in perennial ryegrass. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 1527–1533.
- (41) Keogh, R. G.; Tapper, B. A.; Fletcher, R. H. Distributions of the fungal endophyte *Acremonium lolii*, and of the alkaloids lolitrem B and peramine, within perennial ryegrass. *N. Z. J. Agric. Res.* **1996**, *39*, 121–127.
- (42) Protin, P. V.; Corre-Hellou, G.; Naudin, C.; Trochard, R. Effects of fertilisation practices on the productivity of pastures and of mixtures of cereals and high-protein crops and on the quality of the forage. *Fourrages* **2009**, *115*–130.
- (43) Rasmussen, S.; Parsons, A. J.; Bassett, S.; Christensen, M. J.; Hume, D. E.; Johnson, L. J.; Johnson, R. D.; Simpson, W. R.; Stacke, C.; Voisey, C. R.; Xue, H.; Newman, J. A. High nitrogen supply and carbohydrate content reduce fungal endophyte and alkaloid concentration in *Lolium perenne*. *New Phytol.* **2007**, *173*, 787–797.
- (44) Hunt, M. G.; Rasmussen, S.; Newton, P. C. D.; Parsons, A. J.; Newman, J. A. Near-term impacts of elevated CO₂, nitrogen and fungal endophyte-infection on *Lolium perenne* L. growth, chemical composition and alkaloid production. *Plant Cell Environ.* **2005**, *28*, 1345–1354.

CONCLUSION GENERALE



Conclusion générale

La forme anamorphe des champignons endophytes du genre *Epichloë* (anciennement *Neotyphodium*, Leuchtman et al., 2014) colonise l'espace intercellulaire de certaines graminées prairiales. Les associations symbiotiques les plus étudiées concernent : le Ray grass anglais (RGA) (*Lolium perenne*) avec *Epichloë festucae* var. *lolii* et la Fétuque élevée (FE) (*L. arundinaceum*) avec *E. coenophiala*. Ces champignons peuvent synthétiser différents types d'alcaloïdes. Certains ont des propriétés insecticides ou répulsives comme la péramine et les lolines et d'autres sont toxiques pour les mammifères comme le lolitrème B (LB) et l'ergovaline (EV).

Mon travail de thèse, en collaboration avec différents partenaires du projet, a permis de préciser les facteurs de risques potentiels de graminées fourragères endophytées toxinogènes. Le résumé des principaux résultats obtenus et perspectives figure dans l'encadré 6.

L'analyse de différents écotypes issus d'une large collecte dans le Sud Ouest de la France a mis en évidence une forte prévalence de FE (60%) et RGA (70%) endophytés. Par ailleurs, 100% des FE et près de 75% des RGA endophytés se sont révélés capables de produire des mycotoxines à des niveaux potentiellement élevés. **Un travail effectué en collaboration avec l'équipe de l'EDB (UMR 5174 UPS-CRNS-ENFA) a permis de mettre en relation la capacité génétique de l'endophyte à produire du LB et l'expression *in fine* de cette aptitude dans la plante.** En outre, le profil des souches capables de synthétiser et produisant du LB semble indiquer une sélection liée à des paramètres climatiques, comme les conditions de sécheresse et de la chaleur en été. Une partie de la variabilité observée sur les concentrations en LB pourrait découler d'une sélection génétique ou d'une régulation épigénétique qui reste à caractériser. **Bien que coûteuse pour le champignon la synthèse de LB semble être une réponse de la plante à certains stress abiotiques** contrairement aux idées reçues concernant le rôle du LB dans la protection de la plante contre les animaux pâturant. Ces résultats rejoignent les propriétés supposées des lolines qui modifieraient le potentiel osmotique du végétal et permettraient ainsi de diminuer les effets du stress hydrique (Bush et al., 1997). Cette piste de réflexion reste à explorer.

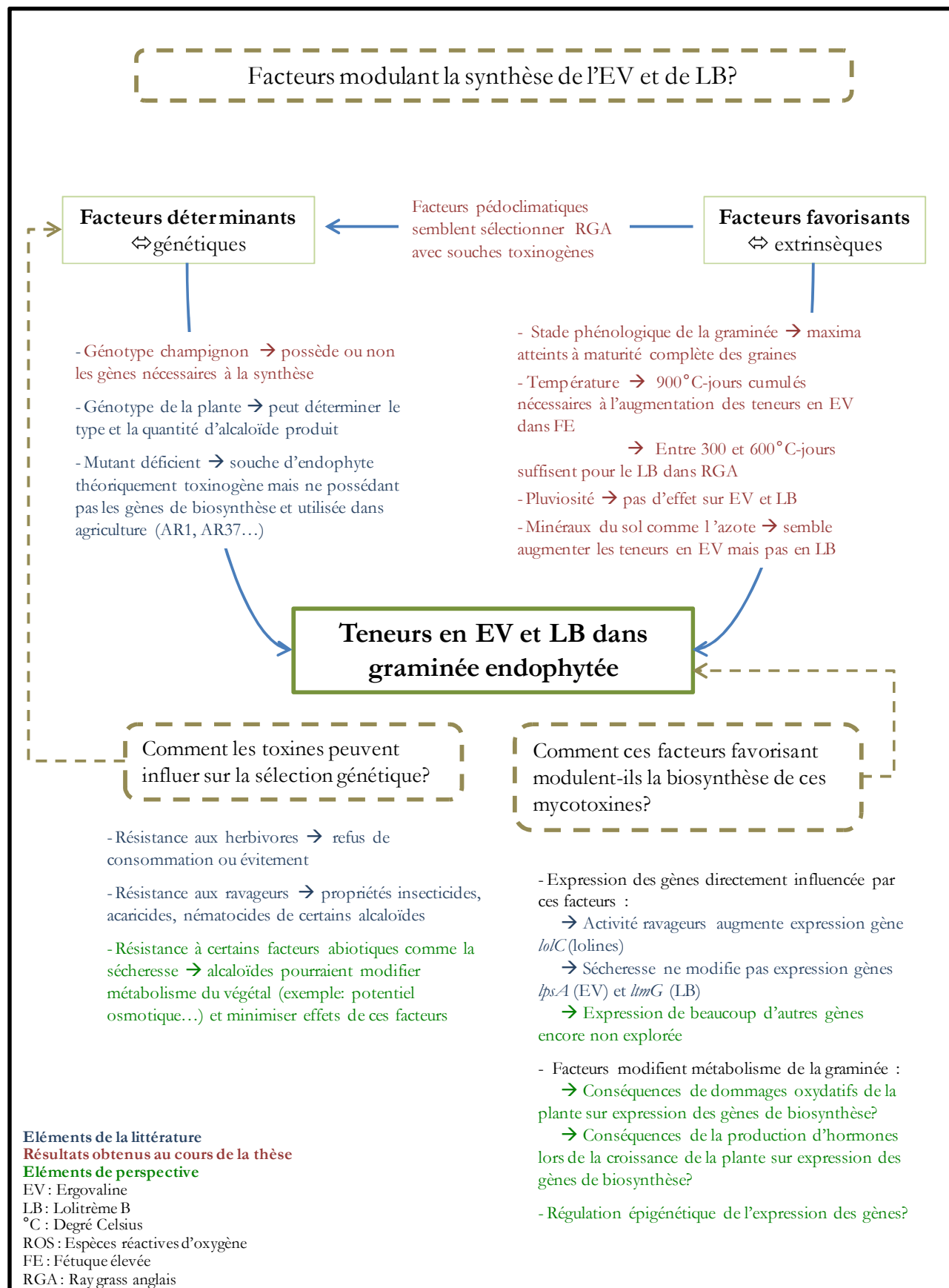
Le suivi au champ de la production en EV et en LB dans la FE et le RGA a permis de montrer que les concentrations en EV obtenues dans la FE à certains stades de son développement sont du niveau des doses réputées toxiques pour les mammifères. **Trois**

périodes à risque ont été mises en évidence : la fin du printemps, le début de l'automne et les hivers doux. Le suivi des teneurs en alcaloïdes pendant trois ans et l'analyse de leur répartition dans la plante ont permis de mettre en évidence que **le stade phénologique (maturité de la plante) était le facteur favorisant clé dans les variations de teneurs en EV dans la FE et en EV et LB dans le RGA.** L'analyse de l'impact de différents facteurs abiotiques (températures, pluies, azote) a mis en évidence l'intérêt du suivi du cumul de températures (degrés-jours) dans l'évaluation des teneurs en EV et LB dans les deux graminées fourragères. **L'EV commence à s'accumuler dans la plante à partir de 900 degrés-jours cumulés et ce aussi bien dans la FE que le RGA.** Les teneurs maximales, systématiquement observées au stade de maturité, ont toutefois fortement varié selon les années, et ce aussi bien dans la FE que le RG. En revanche, le LB s'accumule dans la plante dès 300 degrés-jours, et même si les concentrations maximales sont obtenues au stade de maturité complète des graines, elles sont apparues très voisines d'une année sur l'autre. Ces résultats suggèrent que **l'impact des facteurs abiotiques sur les teneurs en alcaloïdes dans la plante est différent selon la toxine considérée mais semble identique entre FE et RGA.** L'ensemble de ces résultats met en évidence l'implication de facteurs simples modulant la production de toxines et qui pourraient ainsi être un « outil de gestion » du risque mycotoxique à l'échelle de l'exploitation agricole.

Différentes hypothèses et perspectives peuvent être émises à l'issue de ces travaux. Les facteurs modulant la synthèse de ces mycotoxines sont nombreux et complexes. L'hypothèse d'une régulation directe de l'expression des voies de biosynthèse par un facteur abiotique comme le stress hydrique a déjà été testé (Hahn et al., 2008). Aucun lien direct n'a pu être mis en évidence lors de cette étude sur RGA, néanmoins seul un gène des voies de biosynthèse de l'EV et un gène de celles du LB ont été testés sur l'ensemble de ceux nécessaires (plus d'une dizaine pour chacune de ces deux mycotoxines). D'autres mécanismes pourraient être impliqués. L'analyse des facteurs responsables de l'expression des gènes des voies de biosynthèse des alcaloïdes ergotiques et des indole-diterpènes *in planta* révèle qu'une signalisation spécifique de la plante est nécessaire à leur expression (Tanaka et al, 2005; Young et al, 2006). On peut ainsi supposer que des modifications métaboliques de la graminée pourraient être à l'origine de changements dans l'expression des voies de biosynthèses des alcaloïdes. Un déficit hydrique conduit à des dommages oxydatifs pour la plante (Jiang & Huang, 2001 ; Xu et al., 2006) dont l'intensité serait fortement réduite par certains champignons

endophytes (Hamilton & Bauerle, 2012 ; White & Torres, 2010 ; Zhang & Nan, 2007). La présence d'espèces réactives de l'oxygène pourrait également modifier l'expression des voies de biosynthèse des alcaloïdes. Au final, le principal résultat de ce travail conduit au champ semble montrer l'importance de l'analyse des processus biochimiques et physiologiques pouvant contrôler la biosynthèse des alcaloïdes. Ces voies de recherche sont largement inexplorées, alors que de nombreux travaux existent sur la variabilité génétique des endophytes et l'impact que cette variabilité engendre sur les capacités de synthèse des mycotoxines.

Encadré 6 : Principaux résultats et perspectives



Références bibliographiques

ARECHAVALÉTA M., BACON C., HOVELAND C., RADCLIFFE D.: Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. *Agron. J.*, 1989, **81**, 83-90.

ARECHAVALÉTA M., BACON C.W., PLATTNER R.D., HOVELAND C.S., RADCLIFFE D.E.: Accumulation of ergopeptide alkaloids in symbiotic tall fescue grown under deficits of soil water and nitrogen fertilizer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, **58**, 857–861.

BACON C., DE BATTISTA J.: Endophytic fungi of grasses. *In*: AVORA D., RAI B., MUKERJI K., KNUDSEN G. (Eds.): Soil and plants, Marcel Dekker, New York, 1990, 231-256.

BACON C., WHITE C.: Stains, media and procedures for analyzing endophytes. *In* : BACON C., WHITE J. Jr. (Eds): Biotechnology of endophytic fungi of grasses, CRC Press, 1994, 47-56.

BACON C.W., SIEGEL M.R.: Endophyte parasitism of tall fescue. *J. Prod. Agric.*, 1988, **1**, 45-55.

BACON C.W.: Toxic endophyte-infected tall fescue and range grasses: historic perspectives. *J. Anim. Sci.*, 1995, **73**, 861–870.

BALL O., BARKER G., PRESTIDGE R., SPROSEN J.: Distribution and accumulation of the mycotoxin lolitrem B in *Neotyphodium lolii*- infected perennial ryegrass. *J. Chem. Ecol.*, 1997, **23**, 1435-1449.

BALL O., COUDRON T., TAPPER B., DAVIES E., TRENTLY D., BUSH L., GWINN K., POPAY A.: Importance of host plant species, *Neotyphodium* endophyte isolate, and alkaloids on feeding by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *J. Econ. Entomol.*, 2006, **99**, 1462-1473.

BALL O.J., PRESTIDGE R.A., SPROSEN J.M.: Interrelationships between *Acremonium lolii*, peramine, and lolitrem B in perennial ryegrass. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, **61**, 1527–1533.

BELESKY D., MALINOWSKI D.: Abiotic stresses and morphological plasticity and chemical adaptations of *Neotyphodium*-infected tall fescue plants. *In*: BACON C., WHITE J. Jr. (Eds): Microbial endophytes, Marcel Dekker, New York, 2000, 455-485.

- BELESKY D., STRINGER W., HILL N.: Influence of endophyte and water regime upon tall fescue accessions. I. Growth characteristics. *Ann. Bot.*, 1989, **63**, 495-503.
- BELESKY D.P., STUEDEMANN J.A., PLATTNER R.D., WILKINSON S.R.: Ergopeptine Alkaloids in Grazed Tall Fescue. *Agron. J.*, 1988, **80**, 209-212.
- BENKHELIL A., GRANCHER D., GIRAUD N., BEZILLE P., BONY S.: Intoxication par des toxines de champignons endophytes chez des taureaux reproducteurs. *Revue Med. Vet.*, 2004, **156**, 243-247.
- BERNY, P., JAUSSAUD, P., DURIX, A., RAVEL, C., BONY, S.: Rapid determination of the mycotoxin lolitrem B in endophyte-infected perennial ryegrass by high-performance thin-layer chromatography: A validated assay. *J. Chrom. A*, 1997, **769**, 343-348.
- BERTONI M., CABRAL D., ROMERO N., DUBCOVSKY J.: Endophitos fungicos en especies SudAmericanas de *Festuca* (Poaceae). *Boletin de la Sociedad Argentina de Botanica*, 1993, **39**, 25-34.
- BLANKENSHIP J., HOUSEKNECHT J., PAL S., BUSH L., GROSSMAN R., SCHARDL C.: Biosynthetic precursors of fungal pyrrolizidines, the loline alkaloids. *ChemBioChem*, 2005, **6**, 1016-1022.
- BLANKENSHIP J., SPIERING M., WILKINSON H., FANNIN F., BUSH L., SCHARDL C.: Production of loline alkaloids by the grass endophyte, *Neotyphodium uncinatum*, in defined media. *Phytochemistry*, 2001, **58**, 395-401.
- BONY S., COLLIN E., PERRET DU CRAY G., RAVEL C., DELATOUR P.: Endophyte toxicosis : Observations on an outbreak of « ryegrass staggers » in a dairy cow herd in France. *Revue Med. Vet.*, 1998, **6**, p. 628.
- BONY S., EMILE J-C., DURIX A., RAVEL C.; GUILLAUMIN J-J.; GHESQUIERE M.: Incidences des toxines de champignons endophytes des graminées sur les herbivores en conditions européenne. *Renc. Rech. Ruminants*, 2001a, **8**, 149-152.
- BONY S., PICHON N., RAVEL C., DURIX A., BALFOURIER F., GUILLAUMIN J-J.: The relationship between mycotoxin synthesis and isolate morphology in fungal endophytes of *Lolium perenne*. *New Phytol.*, 2001b, **152**, 125-137.

BOUTON J.H., LATCH G., HILL N.S., HOVELAND C.S., MCCANN M.A., WATSON R.H., PARISH J.A., HAWKINS L.L., THOMPSON F.N.: Reinfection of tall fescue cultivars with non-ergot alkaloid-producing endophytes. *Agron. J.*, 2002, **94**, 567–574.

BRAKHAGE A.: Regulation of fungal secondary metabolism. *Microbiology*, 2013, **11**, 21-32.

BRESSOLLE F., BROMET-PETIT M., AUDRAN M.: Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods Applications to pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.*, 1996, **686**, 3-10.

BROSI G.B., MCCULLEY R.L., BUSH L.P., NELSON J.A., CLASSEN A.T., NORBY R.J.: Effects of multiple climate change factors on the tall fescue-fungal endophyte symbiosis: infection frequency and tissue chemistry. *New Phytol.*, 2011, **189**, 797-805.

BROWN K.R., ANDERSON G.A., SON K., RENTFROW G., BUSH L.P., KLOTZ J.L., STRICKLAND J.R., BOLING J.A., MATTHEWS J.C.: Growing steers grazing high versus low endophyte (*Neotyphodium coenophialum*)-infected tall fescue have reduced serum enzymes, increased hepatic glucogenic enzymes, and reduced liver and carcass mass. *J. Anim. Sci.*, 2009, **87**, 748–760.

BULTMAN T., BELL G., MARTIN W.: A fungal endophyte mediates reversal of wound-induced resistance and constrains tolerance in a grass. *Ecology*, 2004, **85**, 679-685.

BUSH L.P., WILKINSON H.H., SCHARDL C.L.: Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiol.*, 1997, **114**, 1-7.

CAGAŠ, FLIEGER, OLŠOVSKÁ: Concentration of ergot alkaloids in Czech ecotypes of *Lolium perenne* and *Festuca pratensis*. *Grass Forage Sci.*, 1999, **54**, 365-370.

CAPORAL-GAUTIER J., NIVET J.M., ALGRANTI P., GUILLOTEAU M., HISTE M., LALLIER M., N'GUYEN-HUU J.J., RUSSOTTO R.: Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. I : Méthodologie. *STP Pharma Prat.*, 1992, **2**, 205-226.

CHAOUCHE K., NEPPEL L., DIEULIN C.: Analyses of precipitation, temperature and evapotranspiration in a French Mediterranean region in the context of climate change. *Comptes Rendus Geosci*, 2010, **342**, 234 -243.

- CHEPLICK G.P.: Effect of simulated acid rain on the mutualism between tall fescue (*Festuca arundinacea*) and an endophytic fungus (*Acremonium coenophialum*). *Int. J. Plant Sci.*, 1993, **154**, 134-143.
- CHEPLICK G.P.: Effects of endophytic fungi on the phenotypic plasticity of *Lolium perenne* (Poaceae). *Am. J. Bot.*, 1997, **84**, 34-40.
- CHEPLICK G.P.: Recovery from drought stress in *Lolium perenne* (Poaceae): are fungal endophytes detrimental? *Am. J. Bot.*, 2004, **91**, 1960-1968.
- CHEPLICK G.P.: Costs of fungal endophyte infection in *Lolium perenne* genotypes from Eurasia and North Africa under extreme resource limitation. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, **60**, 202-210.
- CHEPLICK G., CLAY K.: Acquired chemical defences in grasses: the role of fungal endophytes. *Oikos*, 1988, **52**, 309-318.
- CHEPLICK G., FAETH S.: Ecology and evolution of the grass- endophyte symbiosis, 241 pages, Oxford University Press, New York, USA, 2009.
- CHEPLICK G., CLAY K., MARKS S.: Interactions between infection by endophytic fungi and nutrient limitation in the grasses *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. *New Phytol.*, 1989, **111**, 89-97.
- CHRISTENSEN M., BENNETT R., SCHMID J.: Growth of *Epichloë* / *Neotyphodium* and p-endophytes in leaves of *Lolium* and *Festuca* grasses. *Mycol. Res.*, 2002, **106**, 93-106.
- CHRISTENSEN M.J., LEUCHTMANN A., ROWAN D.D., TAPPER B.A.: Taxonomy of *Acremonium* endophytes of tall fescue (*Festuca arundinacea*), meadow fescue (*F. pratensis*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Mycol. Res.*, 1993, **97**, 1083–1092.
- CLAY K., HARDY T., HAMMOND A. Jr.: Fungal endophytes of grasses and their effects on an insect herbivore. *Oecologia*, 1985, **66**, 1-5.
- CLAY K., HOLAH J., RUDGERS J.: Herbivores cause a rapid increase in hereditary symbiosis and alter plant community composition. *PNAS*, 2005, **102**, 12465-12470.

CLAY K., SCHARDL C.: Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist*, 2002, **160**, 99-127.

CLAY K.: Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. *Oecologia*, 1987, **73**, 358-362.

CLAY K.: Fungal endophytes of grasses. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 1990, **21**, 275-297.

CLAY K.: Fungi and the food of the gods. *Nature*, 2004, **427**, 401-402.

CLEMENT S., ELBERSON L., BOSQUE-PEREZ N., SCHOTZKO D.: Detrimental and neutral effects of wild barley-*Neotyphodium* fungal associations on insect survival. *Entomol. Exp. Appl.*, 2005, **114**, 119-125.

CLEMENT S.L., ELBERSON L.R., YOUSSEF N.N., DAVITT C.M., DOSS R.P.: Incidence and Diversity of *Neotyphodium* Fungal Endophytes in Tall Fescue from Morocco, Tunisia, and Sardinia. *Crop Sci.*, 2001, **41**, 570–576.

COMPANT S., REITER B., SESSITSCH A., NOWAK J., CLEMENT C., BARKA E.: Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 1685-1693.

DELOZIER V., PELTIER D., JALOUZOT R.: Development of SCARs useful for species identification in the genus *Lolium*. *Agronomie*, 1999, **19**, 145-153.

DOBRINDT L., STROH H-G., ISSELSTEIN J., VIDAL S.: Infected–not infected: Factors influencing the abundance of the endophyte *Neotyphodium lolii* in managed grasslands. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 2013, **175**, 54 - 59.

DOMBROWSKI J., BALDWIN J., AZEVEDO M., BANOWETZ G.: A sensitive PCR-based assay to detect *Neotyphodium* fungi in seed and plant tissue of tall fescue and ryegrass species. *Crop Sci.*, 2006, **46**, 1064-1070.

DOSS R., CLEMENT S., KUY S., WELTY R.: A PCR-based technique for detection of *Neotyphodium* endophytes in diverse accessions of tall fescue. *Plant Dis.*, 1998, **82**, 738-740.

DOSS R., WELTY R.: A polymerase chain reaction-based procedure for detection of *Acremomiun coenophialum* in tall fescue. *Phytopathology*, 1995, **85**, 913-917.

DURIX A., RAVEL C., BONY S., BALFOURIER F., GUILLAUMIN J.-J., GHESQUIERE M., CHOSSON J.-F., CHARMET G.: The influence of toxic *Neotyphodium* endophytes on perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Revue Med. Vet.*, 1998, **6**, 528.

DURIX A., JAUSSAUD P., GARCIA P., BONNAIRE Y., BONY, S.: Analysis of ergovaline in milk using high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chrom. B*, 1999, **729**, 255-263.

DURU M., CRUZ P., MARTIN G., THEAU J.P., CHARRON-MOIREZ M.H., DESANGE M., JOUANY C., ZEROUROU A.: Herb'sim: un modèle pour raisonner la production et l'utilisation de l'herbe. *Fourrages*, 2010, **201**, 37-46.

DURU M., CRUZ P., MARTIN G., THEAU J.P., CHARRON-MOIREZ M.H., DESANGE M., JOUANY C., ZEROUROU A.: Herb'sim: un modèle pour raisonner la production et l'utilisation de l'herbe. *Fourrages*, 2010, **201**, 37-46.

EASTON H.S., LANE G.A., TAPPER B.A., KEOGH R.G., COOPER B.M., BLACKWELL M., ANDERSON M., FLETCHER L.R.: Ryegrass endophyte-related heat stress in cattle. *In: Proceedings of the New Zealand Grassland Association*. 1996, **57**, 37-41.

EASTON H.S., LATCH G.C.M., TAPPER B.A., BALL O.-P.: Ryegrass host genetic control of concentrations of endophyte-derived alkaloids. *Crop Sci.*, 2002, **42**, 51-57.

EERENS J., LUCAS R., EASTON S., WHITE J.: Influence of the endophyte (*Neotyphodium lolii*) on morphology, physiology, and alkaloid synthesis of perennial ryegrass during high temperature and water stress. *New Zeal. J. Agr. Res.*, 1998a, **41**, 219-226.

EERENS J.P.J., LUCAS R.J., EASTON H.S., WHITE J.G.H.: Influence of the ryegrass endophyte (*Neotyphodium lolii*) in a cool moist environment. I. Pasture production. *N. Z. J. Agric. Res.*, 1998b, **41**, 39-48.

EFSA: Ergot alkaloids in food and feed. *EFSA Journal*, 2012, **10**, 158p.

- ELMI A., WEST C.: Endophyte infection effects on stomatal conductance, osmotic adjustment, and drought recovery of tall fescue. *Grass Forage Sci.*, 1995, **131**, 61-67.
- EMILE J-C., BONY S., GHESQUIERE M.: Influence of consumption in endophyte-infested tall fescue on performance of heifers and lambs. *J. Anim. Sci.*, 2000, **78**, 358-364.
- EURACHEM G.: The fitness for purpose of analytical methods. *Lab. Guide Method Valid. Relat. Top.*, 1998.
- EZRA D., HESS W., STROBEL G.: New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology*, 2004, **150**, 4023-4031.
- FAETH S., BUSH L., SULLIVAN T.: Peramine alkaloid variation in Neotyphodium-infected Arizona fescue: Effects of endophyte and host genotype and environment. *J. Chem. Ecol.*, 2002, **28**, 1511-1526.
- FAETH S., GARDNER D., HAYES C., JANI A., WITTLINGER S., JONES T.: Temporal and spatial variation in alkaloid levels in *Achnatherum robustum*, a native grass infected with the endophyte *Neotyphodium*. *J. Chem. Ecol.*, 2006, **32**, 307-324.
- FAETH S., HAASE S., SACKETT S., SULLIVAN T., KEITHLEY R., HAMILTON C.: Does fire maintain symbiotic, fungal endophyte infections in native grasses? *Symbiosis*, 2002, **32**, 211-228.
- FAETH S.: Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *Oikos*, 2002, **98**, 25-36.
- FANNIN F., BUSH L., SIEGEL M., ROWAN D.: Analysis of peramine in fungal endophyte-infected grasses by reversed-phase thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1990, **503**, 288-292.
- FELLER I.: Effects of nutrient enrichment on growth and herbivory of dwarf red mangrove (*Rhizophora mangle*). *Ecol. Monogr*, 1995, **65**, 477-505.
- FLETCHER L.: Novel endophytes in New Zealand grazing systems: The perfect solution or a compromise? *In*: YOUNG C., AIKEN G., McCULLEY R., STRICKLAND J., SCHARDL C. (Eds.): *Epichloae*, endophytes of cool season grasses: Implications, utilization and biology, MSA ISFEG, Lexington, 2010, 5-13.

- FORT F., JOUANY C., CRUZ, P.: Root and leaf functional trait relations in Poaceae species: implications of differing resource-acquisition strategies. *J. Plant Ecol.*, 2012, **6**, 211-219.
- FRANCIS S., BAIRD D.: Increase in the proportion of endophyte-infected perennial ryegrass plants in overdrilled pastures. *New Zeal. J. Agr. Res.*, 1989, **32**, 437-440.
- GALLAGHER R., HAWKES A.: The potent tremorgenic neurotoxins lolitrem B and aflatrem: A comparison of the tremor response in mice. *Experientia*, 1985, **42**, 823-825.
- GALLAGHER R., WHITE E., MORTIMER P.: Ryegrass staggers: isolation of potent neurotoxins lolitrem A and lolitrem B from staggers-producing pastures. *New Zeal. Vet. J.*, 1981, **29**, 189-190.
- GALLAGHER R.T., CAMPBELL A.G., HAWKES A.D., HOLLAND P.T., MCGAVESTON D.A., PANSIER E.A., HARVEY I.C.: Ryegrass Staggers: The Presence of Lolitrem Neurotoxins in Perennial Ryegrass Seed. *N. Z. Vet. J.*, 1982, **30**, 183-184.
- GALLAGHER R.T., HAWKES A.D., STEWART J.M.: Rapid determination of the neurotoxin lolitrem B in perennial ryegrass by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, 1985, **321**, 217-226.
- GARNER G.B., ROTTINGHAUS G.E., CORNELL C.N., TESTERECI H.: Chemistry of compounds associated with endophyte/grass interaction: ergovaline- and ergopeptine-related alkaloids. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 1993, **44**, 65-80.
- GARTHWAITE I., SPROSEN J., BRIGGS L., COLLIN R., TOWERS N.: Food quality on the farm: Immunological detection of mycotoxins in New Zealand pastoral agriculture. *Food Agric. Immunol.*, 1994, **6**, 123-129.
- GATENBY W., MUNDAY-FINCH S., WILKINS A., MILES C.: Terpendole M, a novel indole-diterpenoid isolated from *Lolium perenne* infected with the endophytic fungus *Neotyphodium lolii*. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 1092-1097.
- GENSOLLEN V., STRAEBLER M., DE GOYON B., HUYGHE C., TESSIER R. : Les évolutions réglementaires dans le domaine des variétés et des semences. *Fourrages*, 2005, **182**, 237-244.

GIBERT A., MAGDA D., HAZARD L.: Endophytic fungus fine-tunes the persistence strategy of its alpine host grass in response to soil resource levels. *Oikos*, 2012, **122**, 367-376.

GIBERT A., VOLAIRE F., BARRE P., HAZARD L.: A fungal endophyte reinforces population adaptive differentiation in its host grass species. *New Phytol.*, 2012, **194**, 561-571.

GLENN A.E., BACON C.W., PRICE R., HANLIN R.T.: Molecular Phylogeny of *Acremonium* and Its Taxonomic Implications. *Mycologia*, 1996, **88**, 369-383.

GONZALO-TURPIN H., BARRE P., GIBERT A., GRISARD A., WEST C., HAZARD L.: Co-occurring patterns of endophyte infection and genetic structure in the alpine grass, *Festuca eskia*: implications for seed sourcing in ecological restoration. *Conserv. Genet.*, 2010, **11**, 877-887.

GORISCHEK A.M., AFKHAMI M.E., SEIFERT E.K., RUDGERS J.A.: Fungal symbionts as manipulators of plant reproductive biology. *Am. Nat.*, 2013, **181**, 562-570.

GUILLAUMIN J.J., FRAIN M., PICHON N., RAVEL C.: Survey of the fungal endophytes in wild grass species of the Auvergne region (central France). In: The Grassland Conference. 2000, 93-97.

GWINN K., COLLINS-SHEPARD M., REDDICK B.: Tissue print-immunoblot, an accurate method for the detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue. *Phytopathology*, 1991, **81**, 747-748.

HAHN H., McMANUS M., WARNSTORFF K., MONAHAN B., YOUNG C., DAVIES E., TAPPER B., SCOTT B.: *Neotyphodium* fungal endophytes confer physiological protection to perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) subjected to a water deficit. *Environ. Exp. Bot.*, 2008, **63**, 183-199.

HAMILTON C.E., BAUERLE T.L.: A new currency for mutualism? Fungal endophytes alter antioxidant activity in hosts responding to drought. *Fungal Divers.*, 2012, **54**, 39-49.

HAMMER Ø., HARPER D.A.T., RYAN P.D.: PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.*, 2001, 4:9.

HERD S., CHRISTENSEN M., SAUNDERS K., SCOTT B., SCHMID J.: Quantitative assessment of *in planta* distribution of metabolic activity and gene expression of an endophytic fungus. *Microbiology*, 1997, **143**, 267-275.

HESS M., BARRALIS G., BLEIHOLDER H., BUHR L., EGGERS T.H., HACK H., STAUSS R.: Use of the extended BBCH scale-general for the descriptions of the growth stages of mono; and dicotyledonous weed species. *Weed Res.*, 1997, **37**, 433–441.

HESSE U., HAHN H., ANDREEVA K.: Investigations on the Influence of *Neotyphodium* Endophytes on Plant Growth and Seed Yield of *Lolium perenne* Genotypes. *Crop Sci.*, 2004, **44**, 1689-1695.

HESSE U., SCHÖBERLEIN W., WITTENMAYER L., FORSTER K., WARNSTORFF K., DIEPENBROCK W., MERBACH W.: Effects of *Neotyphodium* endophytes on growth, reproduction and drought-stress tolerance of three *Lolium perenne* L. genotypes. *Grass Forage Sci.*, 2003, **58**, 407-415.

HESSE U., SCHÖBERLEIN W., WITTENMAYER L.: Influence of water supply and endophyte infection (*Neotyphodium spp.*) on vegetative and reproductive growth of two *Lolium perenne* L. genotypes. *Eur. J. Agron.*, 2005, **22**, 45 - 54.

HILL N., AGEE C.: Detection of ergoline alkaloids in endophyte-infected tall fescue by immunoassay. *Crop Sci.*, 1994, **34**, 530-534.

HILL N., PACHON J., BACON C.: *Acremonium coenophialum*-mediated short-and long-term drought acclimation in tall fescue. *Crop Sci.*, 1996, **36**, 665-672.

HOPKINS A.A., YOUNG C.A., PANACCIONE D.G., SIMPSON W.R., MITTAL S., BOUTON J.H.: Agronomic Performance and Lamb Health among Several Tall Fescue Novel Endophyte Combinations in the South-Central USA. *Crop Sci.*, 2010, **50**, 1552.

HOVELAND C., DURHAM R., BOUTON J.: Tall fescue response to clipping and competition with no-till seeded alfalfa as affected by fungal endophyte. *Agron. J.*, 1997, **89**, 119-125.

HOVERMALE J.T., CRAIG A.M.: Correlation of Ergovaline and Lolitrem B Levels in Endophyte-Infected Perennial Ryegrass (*Lolium Perenne*). *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2001, **13**, 323-327.

HUNT M.G., RASMUSSEN S., NEWTON P.C.D., PARSONS A.J., NEWMAN J.A.: Near-term impacts of elevated CO₂, nitrogen and fungal endophyte-infection on *Lolium perenne* L. growth, chemical composition and alkaloid production. *Plant Cell Environ.*, 2005, **28**, 1345-1354.

IANNONE L., PINGET A., NAGABHYRU P., SCHARDL C., DE BATTISTA J.: Beneficial effects of *Neotyphodium tembladerae* and *Neotyphodium pampeanum* on a wild forage grass. *Grass and Forage Science*, 2012, **67**, 382-390.

IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER: Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents, and some other substances. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1999.

ICEAGA F.: Les toxicoses du bétail dues aux *Acremonium*, champignons endophytes, de la fétuque et du ray-grass anglais. Thèse, 1992, Université Paul-Sabatier, Toulouse, 67p.

JACOBSON D.R., CARR S.B., HATTON R.H., BUCKNER R.C., GRADEN A.P., DOWDEN D.R., MILLER W.M.: Growth, physiological responses, and evidence of toxicity in yearling dairy cattle grazing different grasses. *J. Dairy Sci.*, 1970, **53**, 575-587.

JOLY D., BROSSARD T., CARDOT H., CAVAILHES J., HILAL M., WAVRESKY P.: Types of climates on continental France, a spatial construction. *Cybergeo. Eur. J. Geogr.*, 2010.

JUSTUS M., WITTE L., HARTMANN T.: Levels and tissue distribution of loline alkaloids in endophyte-infected *Festuca pratensis*. *Phytochemistry*, 1997, **44**, 51-57.

KEOGH R., LAWRENCE T.: Influence of *Acremonium lolii* presence on emergence and growth of ryegrass seedlings. *New Zeal. J. Agr. Res.*, 1987, **30**, 507-510.

KEOGH R.G., TAPPER B.A., FLETCHER R.H.: Distributions of the fungal endophyte *Acremonium lolii*, and of the alkaloids lolitrem B and peramine, within perennial ryegrass. *N. Z. J. Agric. Res.*, 1996, **39**, 121-127.

KOULMAN A., LANE G., CHRISTENSEN M., FRASER K., TAPPER B.: Peramine and other fungal alkaloids are exuded in the guttation fluid of endophyte-infected grasses. *Phytochemistry*, 2007, **68**, 355-360.

KRAUSS J., HÄRRI S., BUSH L., HUSI R., BIGLER L., POWER S., MÜLLER C.: Effects of fertilizer, fungal endophytes and plant cultivar on the performance of insect herbivores and their natural enemies. *Funct. Ecol.*, 2007, **21**, 107-116.

- KULDAU G., BACON C.: Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biol. Control*, 2008, **46**, 57-71.
- KULDAU G., LIU J-S., WHITE J. Jr., SIEGEL M., SCHARDL C.: Molecular systematics of Clavicipitaceae supporting monophyly of genus *Epichloë* and form genus *Ephelis*. *Mycologia*, 1997, **89**, 431-441.
- LAM C., BELANGER F., WHITE J. Jr., DAIE J.: Invertase activity in *Epichloë* / *Acremonium* fungal endophytes and its possible role in choke disease. *Mycol. Res.*, 1995, **99**, 867-873.
- LANE G., CHRISTENSEN M., MILES C.: Co-evolution of fungal endophytes with grasses: the significance of secondary metabolites. In: BACON C., WHITE J. Jr. (Eds.): *Microbial endophytes*, Marcel Dekker, New York, 2000, 341-388.
- LATCH G., HUNT W., MUSGRAVE D.: Endophytic fungi affect growth of perennial ryegrass. *New Zeal. J. Agr. Res.*, 1985, **28**, 165-168.
- LEBOURGEOIS F., PIEDALLU C.: Appréhender le niveau de sécheresse dans le cadre des études stationnelles et de la gestion forestière à partir d'indices bioclimatiques. *Rev. For. Fr.*, 2005, **57**, 331-356.
- LEGUÉDOIS S., PARTY J-P., DUPOUEY J-P.: The vegetation map of the CNRS going numerical: the geographical database of the vegetation of France. Harmonised vector cover at 1/1 000 000 and georeferenced scan at 1/200 000. *Cybergeo. Eur. J. Geogr.*, 2011.
- LEHTONEN P., HELANDER M., SIDDIQUI S., LEHTO K., SAIKKONEN K.: Endophytic fungi decrease plant virus infections in meadow ryegrass (*Lolium pretense*). *Biol. Letters*, 2006, **2**, 620-623.
- LEUCHTMANN A., BACON C.W., SCHARDL C.L., WHITE J.F., TADYCH M.: Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloe*. *Mycologia*, 2014, **106**, 202-215.
- LEUCHTMANN A., SCHMIDT D., BUSH L.P.: Different levels of protective alkaloids in grasses with stroma-forming and seed-transmitted *Epichloë*/*Neotyphodium* endophytes. *J. Chem. Ecol.*, 2000, **26**, 1025-1036.
- LEUCHTMANN A.: Systematics, distribution, and host specificity of grass endophytes. *Nat. Toxins*, 1992, **1**, 150-162.

- LEWIS G., CLEMENTS R.: A survey of ryegrass endophyte (*Acremonium loliae*) in the U.K. and its apparent ineffectuality on a seedling pest. *J. Agri. Sci.*, 1986, **107**, 633-638.
- LEWIS G., RAVEL C., NAFFAA W., ASTIER C., CHARMET G.: Occurrence of *Acremonium* endophytes in wild populations of *Lolium* spp. in European countries and a relationship between level of infection and climate in France. *Ann. Appl. Biol.*, 1997, **130**, 227-238.
- LEWIS G.: Effects of biotic and abiotic stress on the growth of three genotypes of *Lolium perenne* with and without infection by the fungal endophyte *Neotyphodium lolii*. *Ann. Appl. Biol.*, 2004, **144**, 53-63.
- LEYRONAS C., RAYNAL G.: Presence of *Neotyphodium*-like endophytes in European grasses. *Ann. Appl. Biol.*, 2001, **139**, 119-127.
- LYONS P.C., PLATNER R.D., BACON C.W.: Occurrence of peptide and clavine ergot alkaloids in tall fescue grass. *Science*, 1986, **232**, 487-489.
- MALINOWSKI D., BELESKY D., FEDDERS J.: Endophyte infection may affect the competitive ability of tall fescue grown with red clover. *J. Agron. Crop Sci.*, 1999, **183**, 91-101.
- MALINOWSKI D., BELESKY D., HILL N., BALIGAR V., FEDDERS J.: Influence of phosphorus on the growth and ergot alkaloid content of *Neotyphodium coenophialum*-infected tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant Soil*, 1998, **198**, 53-61.
- MALINOWSKI D., BELESKY D.: Adaptation of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: Mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Sci.*, 2000, **40**, 923-940.
- MALINOWSKI D., BRAUER D., BELESKY D.: The endophyte *Neotyphodium coenophialum* affects root morphology of tall fescue grown under phosphorus deficiency. *J. Agron. Crop Sci.*, 1999, **183**, 53-60.
- MARKS S., CLAY K.: Physiological responses of *Festuca arundinacea* to fungal endophyte infection. *New Phytol.*, 1996, **133**, 727-733.
- MARSHALL D., TUNALI B., NELSON R.: Occurrence of fungal endophyte in species of wild *Triticum*. *Crop Sci.*, 1999, **39**, 1507-1512.

MAY K., BRYANT M., ZHANG X., AMBROSE B., SCOTT B.: Patterns of expression of a lolitrem biosynthetic gene in the *Epiclloë fescucae*-perennial ryegrass symbiosis. *MPMI*, 2008, **21**, 188-197.

McCLENNAN E.: The endophytic fungus of *Lolium*. Part I. *Proceedings of the Royal Society, Victoria (NSW)*, 1920, **11**, 252-301.

McLEOD A., REY A., NEWSHMAN K., LEWIS G., WOLFERSTAN P.: Effects of elevated ultraviolet radiation and endophytic fungi on plant growth and insect feeding in *Lolium perenne*, *Festuca rubra*, *F. arundinacea* and *F. pratensis*. *J. Photoch. Photobio. B.*, 2001, **62**, 97-107.

MEISTER B., KRAUSS J., HÄRRI S., SCHNEIDER V., MÜLLER C.: Fungal endosymbionts affect aphid population size by reduction of adult life span and fecundity. *Basic Appl. Ecol.*, 2006, **7**, 244-252.

MILES C., DI MENNA M., JACOBS S., GARTHWAITE I., LANE G., PRESTIDGE R., MARSHALL S., WILKINSON H., SCHARDL C., BALL O., LATCH G.: Endophytic fungi in indigenous Australasian grasses associated with toxicity to livestock. *Appl. Environ. Microb.*, 1998, **64**, 601-606.

MILES C., MUNDAY S., WILKINS A., EDE R., TOWERS N.: Larger-scale isolation of lolitrem B and structure determination of lolitrem E. *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42**, 1488-1492.

MILNE G.D., RUSSELL A.H., RUSSELL J.R., RUSSELL S.W., RUSSELL P.A.: Experiences of ryegrass endophyte on farms on the East Coast of the North Island. *In*: Woodfield, D.R., Matthew, C. (Eds), Ryegrass endophyte: an essential New Zealand symbiosis. New Zealand Grassland Association, Palmerston North, New Zealand. 1999, **7**, 33-37.

MIRLOHI A., SABZALIAN M., SHARIFNABI B., NEKOUI MK.: Widespread occurrence of *Neotyphodium*-like endophyte in populations of *Bromus tomentellus* Boiss. in Iran. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2006, **256**, 126-131.

MIYAZAKI S., FUKUMURA M., YOSHIOKA M., YAMANAKA N.: Detection of endophyte toxins in the imported perennial ryegrass straw. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.*, 2001, **63**, 1013-1015.

MIYAZAKI S., ISHIZAKI I., ISHIZAKA M., KANBARA T., ISHIGURO-TAKEDA Y.: Lolitrem B residue in fat tissues of cattle consuming endophyte-infected perennial ryegrass straw. *J. Vet. Diag. Invest.*, 2004, **16**, 340-342.

- MONNET F., VAILLANT N., HITMI A., SALLANON H.: Photosynthetic activity of *Lolium perenne* as a function of endophyte status and zinc nutrition. *Funct. Plant Biol.*, 2005, **32**, 131-139.
- MORSE L., DAY T., FAETH S.: Effect of *Neotyphodium* endophyte infection on growth and leaf gas exchange of Arizona fescue under contrasting water availability regimes. *Environ. Exp. Bot.*, 2002, **48**, 257-268.
- MOYANO S., LANUZA F., TORRES A., CISTERNAS E., FUENTES M.: Implementation of a method to determine lolitrem B in ryegrass (*Lolium perenne* L.) by liquid chromatography (HPLC). *ChileanJAR*, 2009, **69**, 455-459.
- MÜLLER C. B., KRAUSS J.: Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2005, **8**, 450-456.
- MUNDAY-FINCH S., MILES C., WILKINS A., HAWKES A.: Isolation and structure elucidation of lolitrem A, a tremorgenic mycotoxin from perennial ryegrass infected with *Acremonium lolii*. *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**, 1283-1288.
- MUNDAY-FINCH S., WILKINS A., MILES C., EDE R., THOMSON R.: Structure elucidation of lolitrem F, a naturally occurring stereoisomer of the tremorgenic mycotoxin lolitrem B, isolated from *Lolium perenne* infected with *Acremonium lolii*. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 2782-2788.
- MUNDAY-FINCH S., WILKINS A., MILES C., TOMODA H., OMURA S.: Isolation and structure elucidation of lolilline, a possible biosynthetic precursor of the lolitrem family of tremorgenic mycotoxins. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 199-204.
- NAFFAA W., RAVEL C., GUILLAUMIN J.: A new group of endophytes in European grasses. *Ann. Appl. Biol.*, 1998, **132**, 211-226.
- NAJAFABADI A.S., MOFID M.R., MOHAMMADI R., MOGHIM S.: Quantification of ergovaline using HPLC and mass spectrometry in Iranian *Neotyphodium* infected tall fescue. *Res. Pharm. Sci.*, 2010, **5**, 135.
- NEIL J.C.: The endophytes of *Lolium* and *Festuca*. *NZ J Sci Technol*, 1941, **23A**, 185-195.

NEWMAN J., ABNER M., DADO R., GIBSON D., BROOKINGS A., PARSONS A.: Effects of elevated CO₂, nitrogen and fungal endophyte-infection on tall fescue: Growth, photosynthesis, chemical composition and digestibility. *Global Change Biol.*, 2003, **9**, 425-437.

NEWSHAM K., LEWIS G., GREENSLADE P., McLEOD A.: *Neotyphodium lolii*, a fungal leaf endophyte, reduces fertility of *Lolium perenne* exposed to elevated UV-B radiation. *Ann. Bot-London*, 1998, **81**, 397-403.

OLDENBURG E.: Endophytic fungi and alkaloid production in perennial ryegrass in Germany. *Grass Forage Sci.*, 1997, **52**, 425-431.

OLIVEIRA J.A., ROTTINGHAUS G.E., PREGO C., GONZÁLEZ A.: Contenido en alcaloides en semillas de poblaciones naturales de raigrás inglés del norte de España infectadas con los hongos endofitos *Neotyphodium*. *Invest Agr Prod Prot Veg*, 2002, **17**, 247–256.

PANACCIONE D., CIPOLETTI J., SEDLOCK A., BLEMININGS K., SCHARDL C., MACHADO C., SEIDEL G.: Effects of ergot alkaloids on food preference and satiety in rabbits, as assessed with gene-knockout endophytes in perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 4582-4587.

PANACCIONE D., TAPPER B., LANE G., DAVIES E., FRASER K.: Biochemical outcome of blocking the ergot alkaloid pathway of a grass endophyte. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 6429-6437.

PANACCIONE D.: Origins and significance of ergot alkaloid diversity in fungi. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, **251**, 9-17.

PETERS A.: Field and culture studies of *Streblonema macrocystis* new species *Ectocarpales phaeophyceae* from Chile, a sexual endophyte of giant kelp. *Phycologia*, 1991, **30**, 365-377.

POPAY A., GERARD P.: Cultivar and endophyte effects on a root aphid, *Aploneura lentisci*, in perennial ryegrass. *N Z Plant Protect.*, 2007, **60**, 223-227.

POPAY A., TOWNSEND R., FLETCHER L.: The effect of endophyte (*Neotyphodium uncinatum*) in meadow fescue on grass grub larvae. *N Z Plant Protect.*, 2003, **56**, 123-128.

- PROTIN P.V., CORRE-HELLOU G., NAUDIN C., TROCHARD R.: Impact des pratiques de fertilisation sur la productivité des prairies et mélanges céréales – protéagineux et la qualité du fourrage.. *Fourrages*, 2009, **198**, 115-130.
- RASMUSSEN S., PARSONS A., NEWMAN J.: Metabolomics analysis of the *Lolium perenne* – *Neotyphodium lolii* symbiosis: More than just alkaloids? *Phytochem. Rev.*, 2009, **8**, 535-550.
- RASMUSSEN S., PARSONS A.J., BASSETT S., CHRISTENSEN M.J., HUME D.E., JOHNSON L.J., JOHNSON R.D., SIMPSON W.R., STACKE C., VOISEY C.R., XUE H., NEWMAN J.A.: High nitrogen supply and carbohydrate content reduce fungal endophyte and alkaloid concentration in *Lolium perenne*. *New Phytol.*, 2007, **173**, 787-797.
- RAVEL C., BALFOURIER F., BALFOURIER F.: Influence of the fungal endophyte *Acremonium lolii* on agronomic traits of perennial ryegrass in France. *Grass Forage Sci.*, 1995, **50**, 75-80.
- RAVEL C., BALFOURIER F., GUILLAUMIN J.: Enhancement of yield and persistence of perennial ryegrass inoculated with one endophyte isolate in France. *Agronomie*, 1999, **19**, 635-644.
- RAVEL C., COURTY C., COUDRET A., CHARMET G.: Beneficial effects of *Neotyphodium lolii* on the growth and the water status in perennial ryegrass cultivated under nitrogen deficiency or drought stress. *Agronomie*, 1997a, **17**, 173-181.
- RAVEL C., MICHALAKIS Y., CHARMET G.: The effect of imperfect transmission on the frequency of mutualistic seed-borne endophytes in natural populations of grasses. *Oikos*, 1997b, **80**, 18-24.
- RAYNAL G., CHAMPION R., SICARD G., DE GOYON B.: Les *Acremonium*, champignons endophytes des graminées, néfastes ou bénéfiques. *Bull. Semences FNAMS*, 1988, **104**, 12-14.
- REDDY P., LAM C., BELANGER F.: Mutualistic fungal endophytes express a proteinase that is homologous to proteases suspected to be important in fungal pathogenicity. *Plant Physiol.*, 1996, **111**, 1209-1218.
- REED K.F.M., WALSH J.R., CROSS P.A., MCFARLANE N.M., SPRAGUE M.A.: Ryegrass endophyte (*Neotyphodium lolii*) alkaloids and mineral concentrations in perennial ryegrass (*Lolium perenne*) from southwest Victorian pasture. *Aust. J. Exp. Agric.*, 2004, **44**, 1185-1194.

- REPUSSARD C., ZBIB N., TARDIEU D., GUERRE P.: Les champignons endophytes du genre *Neotyphodium* et leurs toxines: généralités et problématique française. *Rev. Méd Vét*, 2013, **164**, 583–606.
- REPUSSARD C., TARDIEU D., ALBERICH M., GUERRE P.: A new method for the determination of lolitrem B in plant materials. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2014a, **193**, 141-147.
- REPUSSARD C., ZBIB N., TARDIEU D., GUERRE P.: Endophyte infection of tall fescue and the impact of climatic factors on ergovaline concentrations in field crops cultivated in southern France. *J. Agric. Food Chem.*, 2014b, **62**, 9609-9614.
- REPUSSARD C., ZBIB N., TARDIEU D., GUERRE P.: Ergovaline and Lolitrem B Concentrations in Perennial Ryegrass in Field Culture in Southern France: Distribution in the Plant and Impact of Climatic Factors. *J. Agric. Food Chem.*, 2014c, **62**, 12707-12712.
- RIEDEL W., KIECKHEFER R., PETROSKI R., POWELL R.: Naturally-occurring and synthetic loline alkaloid derivatives: Insect feeding behavior modification and toxicity. *J. Entomol. Sci.*, 1991, **26**, 122-129.
- RODRIGUEZ R., REDMAN R., HENSON J.: The role of fungal symbionts in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 2004, **9**, 261-272.
- ROSENBLUETH M., MARTINEZ-ROMERO E.: Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *MPMI*, 2006, **19**, 827-837.
- ROSCHER C., KUTSCH W. L., SCHULZE E. D.: Light and nitrogen competition limit *Lolium perenne* in experimental grasslands of increasing plant diversity. *Plant Biol.*, 2011, **13**, 134-144.
- ROSCHER C., SCHUMACHER J., WEISSER W. W., SCHULZE E. D.: Genetic identity affects performance of species in grasslands of different plant diversity: an experiment with *Lolium perenne* cultivars. *Ann. Bot.*, 2008, **102**, 113-125.
- ROTTINGHAUS G.E., GARNER G.B., CORNELL C.N., ELLIS J.L.: HPLC method for quantitating ergovaline in endophyte-infested tall fescue: seasonal variation of ergovaline levels in stems with leaf sheaths, leaf blades, and seed heads. *J. Agric. Food Chem.*, 1991, **39**, 112-115.

ROWAN D., DYMOCK J., BRIMBLE M.: Effect of fungal metabolite peramine and analogs on feeding and development of argentine stem weevil (*Listronotus bonariensis*). *J. Chem. Ecol.*, 1990, **16**, 1683-1695.

ROYLANCE J., HILL N., AGEE C.: Ergovaline and peramine production in endophyte-infected tall fescue: Independent regulation and effects of plant and endophyte genotype. *J. Chem. Ecol.*, 1994, **20**, 2171-2183.

SAHA D., JACKSON M., JOHNSON-CICALESE J.: A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grasses. *Phytopathology*, 1988, **78**, 237-239

SAIKIA S., NICHOLSON M., YOUNG C., PARKER E., SCOTT B.: The genetic basis for indole-diterpene chemical diversity in filamentous fungi. *Mycol. Res.*, 2008, **112**, 184-199.

SAIKKONEN K., AHLHLOM J., HELANDER M., LEHTIMÄKI S., NIEMELÄINEN O.: Endophytic fungi in wild and cultivated grasses in Finland. *Ecography*, 2000, **23**, 360-366.

SAIKKONEN K., FAETH S., HELANDER M., SULLIVAN T.: Fungal endophytes: Continuum of interactions with host plant. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 1998, **29**, 319-343.

SAIKKONEN K., LEHTONEN P., HELANDER M., KORICHEVA J., FAETH S.: Model systems in ecology: Dissecting the endophyte-grass literature. *Trends in Plant Science*, 2006, **11**, 428-433.

SAIKKONEN K., WÄLI P., HELANDER M., FAETH S.: Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science*, 2004, **9**, 275-280.

SALMINEN S., GREWAL P.: Does decreased mowing frequency enhance alkaloid production in endophytic tall fescue and perennial ryegrass? *J. Chem. Ecol.*, 2002, **28**, 939-950.

SALVAT A., GODOY H.: A simple thin-layer chromatographic method for the detection of ergovaline in leaf sheaths of tall fescue (*Festuca arundinacea*) infected with *Neotyphodium coenophialum*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2001, **13**, 446-449.

SCHARDL C., GROSSMAN R., NAGABHYRU P., FAULKNER J., MALLIK U.: Loline alkaloids: Currencies of mutualism. *Phytochemistry*, 2007, **68**, 980-996.

- SCHARDL C., LEUTCHMANN A., TSAI H-F., COLLETT M., WATT D., SCOTT B.: Origin of a fungal symbiont of perennial ryegrass by interspecific hybridization of a mutualist with the ryegrass choke pathogen, *Epichloë typhina*. *Genetics*, 1994, **136**, 1307-1317.
- SCHARDL C., PANACCIONE D., TUDZYNSKI P.: Ergot alkaloids – Biology and molecular biology. *Alkaloids Chem. Biol.*, 2006, **63**, 45-86.
- SCHARDL C.L., CRAVEN K.D., SPEAKMAN S.: A novel test for host-symbiont codivergence indicates ancient origin of fungal endophytes in grasses. *Syst. Biol.*, 2008, **57**, 483-498.
- SCHARDL C.L., FLOREA S., PAN J., NAGABHYRU P., BEC S., CALIE P.J.: The *epichloae*: alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2013, **16**, 480-488.
- SCHARDL C.L., LEUCHTMANN A., SPIERING M.J.: Symbiosis of grasses with seedborne fungal endophyte. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2004, **55**, 315-340.
- SCHARDL C.L., YOUNG C.A., FAULKNER J.R., FLOREA S., PAN J.: Chemotypic diversity of epichloae, fungal symbionts of grasses. *Fungal Ecol.*, 2012, **5**, 331-344.
- SCHMIDT S.P., OSBORN T.G.: Effects of endophyte-infected tall fescue on animal performance. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 1993, **44**, 233-262.
- SCHULTHESS F., FAETH S.: Distribution, abundances, and associations of the endophytic fungal community of Arizona fescue (*Festuca arizonica*). *Mycologia*, 1998, **90**, 569-578.
- SCHULZ B., BOYLE C.: The endophytic continuum. *Mycol. Res.*, 2005, **109**, 661-686.
- SIEGEL M., JOHNSON M., VARNEY D., NESMITH W., BUCKNER R., BUSH L., BURRUS II P., JONES T., BOLING J.: A fungal endophyte in tall fescue: Incidence and dissemination. *Phytopathology*, 1984, **74**, 932-937.
- SIEGEL M., LATCH G., BUSH L., FANNIN F., ROWAN D., TAPPER B., BACON C., JOHNSON M.: Fungal endophyte-infected grasses: Alkaloid accumulation and aphid response. *J. Chem. Ecol.*, 1990, **16**, 3301-3315.

SIEGEL M.R., BUSH L.P.: Defensive chemicals in grass-fungal endophyte associations. *In*: ROMEO J., SAUNDERS J., BARBOSA P. (Eds): Phytochemical diversity and redundancy in ecological interactions, Springer US, 1996, **30**, 81-119.

SMITH M., WARREN V., THOMAS B., BROCHU R., ERTEL E., ROHRER S., SCHAEFFER J., SCHMATZ D., PETUCH B., TANG Y., MEINKE P., KACZOROWSKI G., COHEN C.: Nodulisporic acid opens insect glutamate-gated chloride channels: identification of a new high affinity modulator. *Biochemistry-US*, 2000, **39**, 5543-5554.

SOBHANI NAJAFABADI A., MOFID M., MOHAMMADI R., MOGHIM S.: Quantification of ergovaline using HPLC and mass spectrometry in Iranian *Neotyphodium* infected tall fescue. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 2010, **5**, 135-143.

SPIERING M., WILKINSON H., BLANKENSHIP J., SCHARDL C.: Expressed sequence tags and genes associated with loline alkaloid expression by the fungal endophyte *Neotyphodium uncinatum*. *Fungal Genet. Biol.*, 2002a, **36**, 242-254.

SPIERING M., DAVIES E., TAPPER B., SCHMID J., LANE G.: Simplified extraction of ergovaline and peramine for analysis of tissue distribution in endophyte-infected grass tillers. *J. Agric. Food Chem.*, 2002b, **50**, 5856-5862.

SPIERING M., GREER D., SCHMID J.: Effects of the fungal endophyte, *Neotyphodium lolii*, on net photosynthesis and growth rates of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) are independent of *in planta* endophyte concentration. *Annals of Botany*, 2006, **98**, 379-387.

SPIERING M.J., LANE G.A., CHRISTENSEN M.J., SCHMID J.: Distribution of the fungal endophyte *Neotyphodium lolii* is not a major determinant of the distribution of fungal alkaloids in *Lolium perenne* plants. *Phytochemistry*, 2005a, **66**, 195-202.

SPIERING M., MOON C., WILKINSON H., SCHARDL C.: Gene clusters for insecticidal loline alkaloids in the grass-endophytic fungus *Neotyphodium uncinatum*. *Genetics*, 2005b, **169**, 1403-1414.

STAMM M., DELCURTO T., HORNEY M.R., BRANDYBERRY S.D., BARTON R.K.: Influence of alkaloid concentration of tall fescue straw on the nutrition, physiology, and subsequent performance of beef steers. *J. Anim. Sci.*, 1994, **72**, 1068-1075.

STONE J., BACON C., WHITE J. Jr.: An overview of endophytic microbes: Endophytism defined. *In*: BACON C., WHITE J. Jr. (Eds.): *Microbial endophytes*, Marcel Dekker, New York, 2000, 3-29.

SUGAWARA K., OHKUBO H., YAMASHITA M., MIKOSHIBA Y.: Flowers for *Neotyphodium* endophytes detection: a new observation method using flowers of host grasses. *Mycoscience*, 2004, **45**, 222-226.

SULLIVAN T., RODSTROM J., VANDOP J., LIBRIZZI J., GRAHAM C., SCHARDL C., BULTMAN T.: Symbiont-mediated changes in *Lolium arundinaceum* inducible defenses: evidence from changes in gene expression and leaf composition. *New Phytol.*, 2007, **176**, 673-679.

TAKACH J.E., MITTAL S., SWOBODA G.A., BRIGHT S.K., TRAMMELL M.A., HOPKINS A.A., YOUNG C.A.: Genotypic and Chemotypic Diversity of *Neotyphodium* Endophytes in Tall Fescue from Greece. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, **78**, 5501-5510.

TAN Y., SPIERING M., SCOTT V., LANE G., CHRISTENSEN M., SCHMID J.: *In planta* regulation of extension of an endophytic fungus and maintenance of high metabolic rates in its mycelium in the absence of apical extension. *Appl. Environ. Microb.*, 2001, **67**, 5377-5383.

TANAKA A., CHRISTENSEN M., TAKEMOTO D., PARK P., SCOTT B.: Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial ryegrass mutualistic interaction. *The Plant Cell*, 2006, **18**, 1052-1066.

TANAKA A., TAPPER B., POPAY A., PARKER E., SCOTT B.: A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory. *Mol. Microbiol.*, 2005, **57**, 1036-1050.

TAVERNIERI I., DE LOOSE M., VAN BOCKSTAELE E.: Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2004, **23**, 535-552.

TEPASKE M.R., POWELL R.G., CLEMENT S.L.: Analyses of selected endophyte-infected grasses for the presence of loline-type and ergot-type alkaloids. *J. Agric. Food Chem.*, 1993, **41**, 2299-2303.

THOMPSON M., ELLISON S.L.R., WOOD R.: Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 2009, **74**, 835-855.

TOR-AGBIDYE J., BLYTHE L.L., CRAIG A.M.: Correlation of endophyte toxins (ergovaline and lolitrem B) with clinical disease: fescue foot and perennial ryegrass staggers. *Vet. Hum. Toxicol.*, 2001, **43**, 140–146.

VAN ZIJLL DE JONG E., DOBROWOLSKI M.P., BANNAN N.R.: Global Genetic Diversity of the Perennial Ryegrass Fungal Endophyte *Neotyphodium lolii*. *Crop Sci.*, 2008, **48**, 1487–1501.

VIEDEMANN B., BONY S., BERNY P.: Determination of ergovaline in endophyted seeds by high performance thin layer chromatography (HPTLC). *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 2000, **23**, 2727-273.

VILA-AIUB M., GUNDEL P., GHERSA C.: Fungal endophyte infection changes growth attributes in *Lolium multiflorum* Lam. *Austral Ecology*, 2005, **30**, 49-57.

VISENTIN I., MONTIS V., DÖLL K., ALABOUVETTE C., TAMIETTI G., KARLOVSKY P., CARDINALE F.: Transcription of genes in the biosynthetic pathway for fumonisin mycotoxins is epigenetically and differentially regulated in the fungal maize pathogen *Fusarium verticillioides*. *Eukaryot. Cell*, 2012, **11**, 252-259.

WÄLI P., HELANDER M., NISSINEN O., SAIKKONEN K.: Susceptibility of endophyte –infected grasses to winter pathogens (snow molds). *Can. J. Botany*, 2006, **84**, 1043-1051.

WALZEL B., RIEDERER B., KELLER U.: Mechanism of alkaloid cyclopeptide synthesis in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Chem. Biol.*, 1997, **4**, 223-230.

WATSON R.H.: Endophytic perennial ryegrass and reproductive performance of the ewe. PhD, Massey University, Manawatu, New Zealand. 2000.

WELTY R.E., CRAIG A.M., AZEVEDO M.D.: Variability of ergovaline in seeds and straw and endophyte infection in seeds among endophyte-infected genotypes of tall fescue. *Plant Dis.*, 1994, **78**, 845-849.

WEST C.P.: Plant influences on endophyte expression. *In: Proc. 6th Int. Symp. Fungal Endophytes Grasses. Grassl. Res. Practice Series*, 2007, **13**, 117-121

WEST C. P., IZEKOR,E., TURNER K. E., ELM I A. A.: Endophyte effects on growth and persistence of tall fescue along a water-supply gradient. *Agron. J.*, 1993, **85**, 264-270.

WHITE J. Jr., MARTIN T., CABRAL D.: Endophyte-host associations in grasses. XXII. Conidia formation by *Acremonium* endophytes on the phylloplanes of *Agrostis hiemalis* and *Poa rigidifolia*. *Mycologia*, 1996, **88**, 174-178.

WHITE J., MORGAN-JONES G., MORROW A.: Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 1993, **44**, 13-37.

WHITE J.F., TORRES M.S.: Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? *Physiol. Plant.*, 2010, **138**, 440-446.

WHITE J.Jr., SULLIVAN R., BALADY G., GIANFAGNA T., YUE Q., MEYER W., CABRAL D.: A fungal endosymbiont of the grass *Bromus setifolius*: Distribution in some Andean populations, identification, and examination of beneficial properties. *Symbiosis*, 2001, **31**, 241-257.

WILSON A.D., CLEMENT S.L., KAISER W.J.: Survey and detection of endophytic fungi in *Lolium* germ plasm by direct staining and aphid assays. *Plant Dis.*, 1991, **75**, 169-173.

YATES S., PETROSKI R., POWELL R.: Analysis of loline alkaloids in endophyte-infected tall fescue by capillary gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 1990, **38**, 182-185.

YOUNG C., BRYANT M., CHRISTENSEN M., TAPPER B., BRYAN G., SCOTT B.: Molecular cloning and genetic analysis of a symbiosis-expressed gene cluster for lolitrem biosynthesis from a mutualistic endophyte of perennial ryegrass. *Mol. Gen. Genomics*, 2005, **274**, 13-29.

YOUNG C., FELITTI S., SHIELDS K., SPANGENBERG G., JOHNSON R., BRYAN G., SAIKIA S., SCOTT B.: A complex gene cluster for indole-diterpene biosynthesis in the grass endophyte *Neotyphodium lolii*. *Fungal Genet. Biol.*, 2006, **43**, 679-693.

YOUNG C., TAPPER B., MAY K., MOON C., SCHARDL C., SCOTT B.: Indole-diterpene biosynthetic capability of *Epiclloë* endophytes as predicted by *ltm* gene analysis. *Appl. Environ. Microb.*, 2009, **75**, 2200-2211.

YOUNG O.A., LANE G.A., PODMORE C., FRASER K., AGNEW M.J., CUMMINGS T.L., COX N.R.: Changes in composition and quality characteristics of ovine meat and fat from castrates and rams aged to 2 years. *N. Z. J. Agric. Res.*, 2006, **49**, 419-430.

YUE Q., MILLER C., WHITE J. Jr., RICHARDSON M.: Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloë festucae*. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 4687-4692.

ZBIB N., REPUSSARD C., TARDIEU D., GUERRE P.: Toxicité des mycotoxines produites par des champignons endophytes du genre *Neotyphodium*. *Rev. Méd Vét*, 2014, **165**, 116-135.

ZHANG D-X., NAGABHYRU P., BLANKENSHIP J., SCHARDL C.: Are loline alkaloid levels regulated in grass endophytes by gene expression or substrate availability? *Plant Signaling & Behavior*, 2010, **5**, 1419-1422.

ZHANG D-X., STROMBERG A., SPIERING M., SCHARDL C.: Coregulated expression of loline alkaloid-biosynthesis genes in *Neotyphodium uncinatum* cultures. *Fungal Genet. Biol.*, 2009, **46**, 517-530.

ZHANG X., LI C., NAN Z., MATTHEW C.: *Neotyphodium* endophyte increases *Achnatherum inebrians* (drunken horse grass) resistance to herbivores and seed predators. *Weed Res.*, 2011, **52**, 70-78.

ZHANG Y.P., NAN Z.B.: Growth and Anti-Oxidative Systems Changes in *Elymus daburicus* is Affected by *Neotyphodium* Endophyte Under Contrasting Water Availability. *J. Agron. Crop Sci.*, 2007, **193**, 377-386.

ZHOU Y.: *Neotyphodium lolii* endophyte improves drought tolerance in perennial ryegrass (*Lolium perenne*. L) through broadly adjusting its metabolism, PhD, Massey University, Manawatu, New Zealand. 2014.

Auteur : REPUSSARD Céline

Titre en anglais: Study of the factors of toxic alkaloids production by *Epicbloë* fungal endophytes in grasses in the South of France

Directeur de thèse : Pr GUERRE Philippe

Lieu et date de soutenance : Toulouse (ENVT), le 05/12/2015

Résumé en Anglais :

The most studied symbiotic associations *Epicbloë*- cool seasons grasses concern perennial ryegrass (*Lolium perenne*) with *Epicbloë festucae* var. *lolii* and tall fescue (*L. arundinaceum*) with *E. coenophiala*. These fungi can synthesize alkaloids that could be toxic to livestock such as ergovaline and lolitrem B. My thesis work was to explore the factors related to the production of mycotoxins in grasses. Different studies have been conducted on tall fescue and perennial ryegrass to reveal i) the presence of endophyte-infected toxigenic strains in the South West of France and ii) the influence of environmental conditions of Saint-Affrique (Aveyron) on the synthesis of ergovaline and lolitrem B in forage varieties known to be responsible for toxicity on other continents.

Key words : *Epicbloë festucae* var. *lolii*, *Epicbloë coenophiala*, *Lolium arundinaceum*, *Lolium perenne*, ergovaline, lolitrem B, prevalence, temperature, rainfall, nitrogen, BBCH scale.

Discipline administrative : Mycotoxicologie

Intitulé et adresse du laboratoire : UR Mycotoxicologie, ENVT, INP Toulouse, 23 chemin des Capelles, 31076 Toulouse, France

Auteur : REPUSSARD Céline

Titre: Etude des facteurs de production d'alcaloïdes toxiques par des *Epichloë* endophytes de graminées fourragères dans le Sud de la France

Directeur de thèse : GUERRE Philippe

Lieu et date de soutenance : Toulouse (ENVT), le 05/12/2014

Résumé en Français :

Les associations symbiotiques *Epichloë*-graminées fourragères les plus étudiées concernent le Ray grass anglais (*Lolium perenne*) avec *Epichloë festucae* var. *lolii* et la Fétuque élevée (*L. arundinaceum*) avec *E. coenophiala*. Ces champignons peuvent synthétiser des alcaloïdes toxiques pour le bétail tels que l'ergovaline et le lolitrème B. Mon travail de thèse a consisté à explorer les facteurs en lien avec la production de mycotoxines dans les graminées. Pour cela différentes études ont été conduites sur la fétuque et le ray grass afin de révéler i) la présence de souches endophytées toxigènes dans le Sud Ouest de la France et ii) l'influence des conditions agro-environnementales de Saint-Affrique (Aveyron) sur la synthèse d'ergovaline et de lolitrème B dans des variétés fourragères connues pour être responsables de cas de toxicité sur d'autres continents.

Mots clés : *Epichloë festucae* var. *lolii*, *Epichloë coenophiala*, *Lolium arundinaceum*, *Lolium perenne*, ergovaline, lolitrème B, prévalence, température, pluviosité, azote, échelle BBCH

Discipline administrative : Mycotoxicologie

Intitulé et adresse du laboratoire : UR Mycotoxicologie, ENVT, INP Toulouse, 23 chemin des Capelles, 31076 Toulouse, France